EFEITOS RENAIS DA SOBRECARGA CALÓRICA EM RATOS MACHOS SUBMETIDOS OU NÃO A RESTRIÇÃO PROTEICA IN ÚTERO

VICTOR HUGO GONÇALVES RIZZI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular, Estrutural e Funcional*

Patrícia Aline Boer
Orientadora

BOTUCATU – SP

2014

Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil
Tel (14) 3811-6148 Fax (14) 3811-6148 posgraduacao@ibb.unesp.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITOS RENAIS DA SOBRECARGA CALÓRICA EM RATOS MACHOS SUBMETIDOS OU NÃO A RESTRIÇÃO PROTEICA IN ÚTERO

VICTOR HUGO GONÇALVES RIZZI

Prof. Dra. PATRÍCIA ALINE BOER

Orientadora

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: Biologia Celular, Estrutural e Funcional.

Patrícia Aline Boer

BOTUCATU – SP

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Rizzi, Victor Hugo Gonçalves.
Efeitos renais da sobrecarga calórica em ratos machos submetidos ou não a restrição proteica in útero / Victor Hugo Gonçalves Rizzi – 2014. - Botucatu: [s.n.], 2014

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2014.
Orientadora: Patrícia Aline Boer
Assunto CAPES: 20702043

1. Histologia 2.Fisiologia

Palavras-chave: Dieta hiperlipídica, fibrose renal, função renal, programação fetal

Dedico este trabalho

*Aos meus pais, **Luiz e Maria***

De quem Deus me deu a honra de ser filho,
responsáveis pela minha formação, meus exemplos e
meus maiores incentivadores.

Meu amor e minha gratidão por vocês serão eternos.

AGRADECIMENTOS

... a **Deus**, que está sempre presente em minha vida,

... a minha eterna e fiel companheira **Mariana**, por ter sonhado esse sonho comigo, por sempre acreditar na minha capacidade, pelo incentivo em nunca desistir, pela paciência e compreensão da minha ausência e por todo amor e carinho que sempre me deu,

... a minha orientadora **Prof. Dra. Patrícia Aline Boer**, pela oportunidade, amizade, ensinamentos, comprometimento e acompanhamento do meu crescimento científico,

... ao **Prof. Dr. José Antônio Rocha Gontijo**, pela imensa colaboração,

...aos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Programação Fetal, **Carla, Letícia, Heloísa, Agnes, Dani, Carol, Alexandre, Selma e Margarete**, pela amizade, por compartilhar conhecimentos, sonhos e até frustrações nos experimentos rsrs,

... aos colaboradores do Laboratório do Metabolismo Hidrossalino da UNICAMP,

... ao **Prof. Dr. Antônio Francisco Godinho**, pela disponibilidade de usar o biotério do CEATOX

... a **Prof. Dra. Juliana Irani Fratucci de Gobbi**, pela disponibilidade em utilizar suas gaiolas metabólicas,

... aos professores **Dr. Wellerson Rodrigo Scarano, Dra. Flavia Karina Delella e Dr. Tony Fernando Grassi**, pelas contribuições na banca de qualificação,

... aos amigos dos laboratórios vizinhos, pelo compartilhamento de equipamentos, vidrarias e reagentes,

... ao pessoal da Farmacologia, **José Sérgio (Zé) e Fernando (Toca)**, grandes amigos que fiz quando cheguei em Botucatu,

... ao meu grande amigo (quase irmão) **Thiago Aguera**, parceiros desde a graduação, parceiros de treino e de apartamento em Botucatu,

...a **dona “Têra”** pelo cafezinho de toda manhã e a **dona Iolanda** pela limpeza e organização do departamento,

...aos técnicos do departamento pelo auxilio profissional**, Ricardo, Vivian, e ao José Eduardo " Zé"** (o cara que adorava meu Fiat Uno da Barra do Jacaré–PR),

...aos funcionários da Drogal Farmacêutica (filial 73) pela amizade, companheirismo e principalmente pela compreensão,

...aos funcionários da Seção de Pós Graduação do IBB, pela disposição em resolver vários problemas e sempre esclarecer nossas dúvidas,

...ao Instituto de Biociências de Botucatu e ao departamento de Morfologia, por todo suporte dado para a realização desse trabalho,

...a CAPES pelo auxílio financeiro.

"Quem acredita sempre alcança"

(Renato Russo)

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

LISTA DE ABREVIAÇÕES

11-βHSD-2 – 11-β-hidróxiesteróidedesidrogenase tipo 2

AG – ácidos graxos

ANOVA – análise de variância

AT1r - receptor para angiotensina II

ATP – adenosina trifosfato

ANG II – angiotensina II

BRA – bloqueador do receptor de angiotensina II

CCr – clearance de creatinina

CK^+ – clearance de potássio

CLi^+ – clearance de lítio

CNa^+ – clearance de sódio

DAB - 3,3'-diaminobenzidina

EROs – espécies reativas de oxigênio

ET1 – endotelina 1

FEK^+ – fração de excreção de potássio

$FENa^+$ – fração de excreção de sódio

$FEPNa^+$ – fração de excreção proximal de sódio

$FEPPNa^+$ – fração de excreção pós-proximal de sódio

GDNF – fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais

GT- gordura total

HDL – lipoproteína de alta densidade

HIF-1 – fator induzido pela hipóxia

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IECA – inibidores da enzima conversora de angiotensina

IL6 –interleucina 6

IMC – índice de massa corporal

LDL – lipoproteína de baixa densidade

LP – low protein

NF-kβ – fator nuclear kappa beta

NO – óxido nítrico

NP – normal protein

OMS – Organização Mundial da Saúde

PAI-1 – inibidor do ativador de plasminogênio 1

PCR – proteína C reativa

pH – potencial hidrogeniônico

POF - Pesquisas de orçamentos familiares

PT- peso total

SRAA – sistema renina angiotensina aldosterona

TAG – triacilgliceróis

TGFβ – fator de transformação do crescimento beta

TNF-α – fator de necrose tumoral alfa

V1 – fluxo urinário minuto

VEGF – fator de crescimento vascular endotelial

VLDL – lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

RESUMO

Introdução. Estudos anteriores mostram que a restrição proteica gestacional é responsável pela redução do número de néfrons e hipertensão arterial. O aumento da pressão arterial leva a uma hiperfiltração glomerular e consequentemente ruptura da barreira de filtração, com início do quadro de glomeruloesclerose. Além disso, evidências destacam as consequências da dieta hiperlipídica sobre a morfologia e distúrbios funcionais renais. O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito da sobrecarga calórica por dieta hiperlipídica sobre a função e morfologia renal em ratos submetidos à restrição proteica gestacional. **Método.** Após confirmação da prenhez as ratas foram divididos em 2 grupos, sendo grupo NP (normal protein - 17% de caseína na gestação) e grupo LP (low protein - 6% de caseína durante a gestação). Após nascimento a prole de ratos machos foi mantida com ração normal, sendo que da 8ª até a 13ª semana de vida essa prole foi submetida à dieta hiperlipídica (grupos LPH e NPH) ou ração padrão para roedores (grupo LPN e NPN). Foram realizadas análises da função renal, aferição da pressão arterial, imunohistoquímica, microscopia eletrônica de varredura e análise bioquímica do perfil lipídico. **Resultados.** O índice de adiposidade estava reduzido em LPN e aumentado nos grupos NPH e LPH. Observamos aumento da concentração de colesterol total em NPH e LPH, e aumento de colesterol LDL em LPH. A pressão arterial estava significativamente aumentada nos animais do grupo LPH na 10ª e 12ª semana de vida, comparado aos outros grupos no mesmo período. A menor excreção urinária de sódio foi observada nos grupos tratados, enquanto os animais NPH e LPN apresentaram aumento da acidificação urinária de forma tempo-dependente da dieta hiperlipídica. Os grupos LPN, NPH e LPH mostraram um aumento da expressão de AT1r, fator de transformação do crescimento beta (TGFβ-1), colágeno e fibronectina. Durante a análise ultraestrutural observamos achatamento e simplificação podocitária nos grupos tratados, sendo que em LPH as alterações foram mais severas, mostrando podócitos com grandes áreas de rompimento da membrana plasmática. Em paralelo, todos os ratos tratados apresentam significativa excreção urinária de proteínas. Em conclusão, a partir de nosso conhecimento atual, estas são as primeiras demonstrações de que a ingestão de dieta hiperlipídica aumenta a susceptibilidade para doença renal adulta, com mais gravidade em filhotes programados por restrição proteica, causando desordens glomerulares e tubulares o que pode induzir a insuficiência renal.

Palavras chave: Dieta hiperlipídica, fibrose renal, função renal, programação fetal

ABSTRACT

Background. Prior studies show that maternal protein-restricted offspring (LP) have pronounced reduction of nephron number and arterial hypertension associated with unchanged glomerular filtration rate and enhanced glomerular area that may be related with glomerular hyperfiltration/overflow and account for the glomerular filtration barrier breakdown and early glomerulosclerosis. Additionally, evidence is emerging that highlights the far-reaching consequences of high fat diet (HFD) on kidney morphology and function disorders. The present study aims to evaluate the effect of HFD on renal function and morphology in LP rats. **Methods.** Maternal protein-restricted offspring (LP, 6% casein) and normal protein intake rats (NP, 17% casein) were submitted to ingestion of HFD (LPH and NPH, respectively) or standard chow to rodents (LPN and NPN) from 8^{th} to 13^{th} of age. Renal Function, systemic arterial pressure, immunohistochemistry and scanning electron microscopy were performed and biochemical serum parameters analyzed. **Results.** The body adiposity and mass were reduced in LPN which in turn, increased in NPH and LPH groups. Striking increased in total cholesterol was observed in NPH and LPH, and increased LDL in LPH. The blood pressure was significant increase in LPH groups from the 10^{th} and 12^{th} week of life compared to the other groups. A reduced urinary excretion of sodium was observed in low-protein treated rats while NPH and LPH animals presented an increased urinary acidification in time-dependent fashion. The LPN, NPH and LPH groups showed an increased expression of AT1r, transforming growth factor (TGFβ-1), collagen and fibronectin. By ultraestructural analysis we found a pronounced enfacement of foot process in treated groups and HFD-treated offspring showed wear-out of podocytes by rupture of cell membranes. In parallel all treated rats present a significant urinary protein excretion. **Conclusion.** In conclusion, from our present knowledge, these are the first showing that HFD intake, enhance the susceptibility for adult renal disease with more gravity in fetal programed offspring causing tubular and glomeruli disorder that can induce renal failure.

Keywords: High fat diet, kidney fibrosis, renal function, fetal programming

1- INTRODUÇÃO

1.1 – Programação fetal

Até pouco tempo atrás, o baixo ganho de peso e a restrição no consumo de carnes e gorduras era recomendado para gestantes (LUKE et al., 1993). Esta recomendação era feita principalmente para facilitar o parto e obter recém-nascidos saudáveis e com baixo peso corpóreo. A ênfase na alimentação durante o período de gestação modificou-se por volta dos anos 50, onde recém-nascidos de mães que exibiram baixo ganho de peso gestacional apresentavam maior índice de mortalidade infantil, menor desenvolvimento mental e outras anormalidades (THOMSON & BILLEWICZ, 1957).

A desnutrição é um problema mundial, não se restringindo somente aos países subdesenvolvidos. Ela pode ser definida como uma condição que pode gerar doenças, decorrentes do aporte alimentar insuficiente em energia e nutrientes ou ainda com alguma frequência, do inadequado aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos (MONTEIRO, 2003).

A desnutrição materna pode desencadear carências nutricionais para o feto, que vai responder e se adaptar a subnutrição, alterando permanentemente a estrutura e o funcionamento do organismo (MARTIN-GRONERT & OZANNE, 2006).

A desnutrição por restrição de proteínas, tem se tornado um problema para grande parte da humanidade e frequentemente aparece como causa de várias alterações no desenvolvimento humano. No entanto, os mecanismos que relacionam desnutrição e déficits de desenvolvimento ainda não estão totalmente estabelecidos. Em estudos experimentais com animais, algumas alterações produzidas pela desnutrição são mais evidentes, tais como a redução do peso corporal e determinadas alterações no desenvolvimento (SILVA & ALMEIDA, 2006).

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que no Brasil 10% das crianças nascem com baixo peso (< 2500 g). Barker (1995) foi o pioneiro a demonstrar que o baixo peso ao nascer está relacionado ao surgimento de diversas doenças, tendo sugerido que 1 kg de redução do peso ao nascer acarreta aumento de 6 mmHg na pressão arterial aos 60 anos e baseado nestas e outras evidências descreveu a “ hipótese de Barker” , sugerindo que a desnutrição materna promove retardo no crescimento fetal e baixo peso ao nascimento. Especificamente esta hipótese sugere que o nível de consumo de proteínas abaixo do recomendado durante a gestação induz o feto a

adaptações que inclui redução permanente no número de células que podem levar a alterações em órgãos chaves (BARKER, 1995).

As primeiras evidências de que restrições nutricionais durante a gestação provocariam alterações irreversíveis nos fetos surgiram a partir de estudos em indivíduos que vivenciaram a “fome holandesa”. Durante o período da Segunda Guerra Mundial, o governo alemão diminuiu a oferta calórica aos moradores do nordeste da Holanda, sendo que o consumo energético diário dessa população diminuiu de cerca de 1500 kcal para 1000 kcal de abril de 1944 a maio de 1945, chegando ao consumo de cerca de 500 kcal quando ocorreu a libertação da Holanda no fim deste período (BISMARCK-NASR et al., 2008). Estes autores encontraram maior prevalência de obesidade em jovens de 18 anos cujas mães passaram por esta restrição nos dois primeiros trimestres gestacionais. Entretanto jovens cujas mães foram expostas a privação de alimentos durante o ultimo trimestre de gestação, período caracterizado pela multiplicação de adipócitos, não apresentaram obesidade aos 18 anos, o que os levou a conclusão de que o período gestacional no qual ocorre a restrição de alimentos pode determinar a predisposição à obesidade futura (BISMARCK-NASR et al., 2008).

Angelbeck & DuBrul (1983) observaram que a concentração de testosterona em períodos críticos do desenvolvimento cerebral, influenciariam no comportamento sexual de ratos machos e fêmeas. Snoek et al (1990) demonstrou em seu estudo que a restrição de proteínas durante toda gestação, originou uma prole de ratos com redução de células pancreáticas e secreção de insulina a longo prazo. Além de situações adversas na gestação, Bagley & Hayes (1983) observaram que o uso de fenobarbital no período pós natal, aumenta a atividade de enzimas do citocromo P450 em ratos machos e fêmeas adultos. Diante desses e de outros fatos Lucas (1991) foi o primeiro a definir o conceito de "programação fetal" como sendo uma resposta permanente do organismo a um estímulo ou insulto que ocorre em períodos críticos do desenvolvimento.

O desenvolvimento embriofetal é altamente sensível á perturbações no ambiente materno. Assim, estímulos ambientais adversos podem alterar os processos de proliferação e diferenciação celular, levando a pertubações nas vias do desenvolvimento normal para maturação de órgãos e tecidos (LANGLEY-EVANS & McMULLEN, 2010). Conforme mostrado na Figura 1, existem inúmeros sinais ambientais que possuem a capacidade de alterar os processos de desenvolvimento, como fatores nutricionais (McMILLEN & ROBINSON, 2005), estressores psicológicos ou

fisiológicos (LAZINSKI et al., 2008) e desequilíbrios na sinalização endócrina normal entre mãe e feto (SECKL, 2004).

O ambiente adverso durante a vida embriofetal e/ou na infância está relacionado com o risco de desenvolver doença na vida adulta (BARKER, 2004). Esse processo é denominado programação fetal, no qual o ambiente encontrado antes do nascimento ou na infância molda o controle, em longo prazo, da fisiologia dos tecidos e da homeostase corporal (LANGLEY-EVANS, 2009).

Dentre as doenças relacionadas à programação fetal, estudos epidemiológicos demonstram associação entre baixo peso ao nascer e desenvolvimento subsequente de hipertensão, resistência à insulina, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares (BARKER, 1998). Essa associação parece ser independente de fatores de risco ligados ao estilo de vida, tais como consumo de cigarro e álcool, peso e sedentarismo (BARKER et al., 1993).

As alterações moleculares e fisiológicas resultantes desse desequilíbrio nutricional na gestação, permitem a sobrevivência da prole, embora seus efeitos em longo prazo possam promover alterações na estrutura cardiovascular, renal, respiratória, endócrina e nos componentes do sistema nervoso central (BARKER, 1995; FOWDEN et al., 2006).
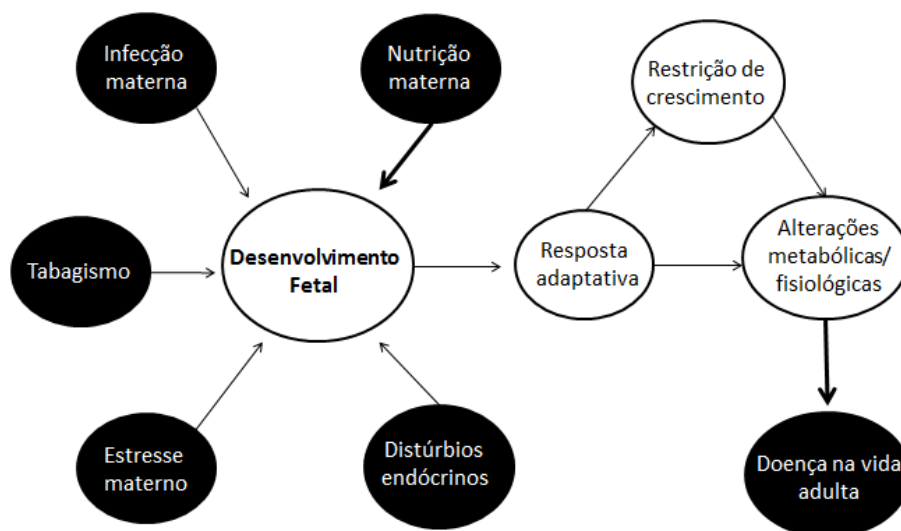
Figura 1. O ambiente materno adverso provoca respostas adaptativas no feto, e uma das respostas é o menor crescimento, que resulta em baixo peso ao nascer. Adaptado de Langley-Evans, (2009).

1.2 – Alterações cardiovasculares e renais decorrentes da programação fetal por restrição proteica

Como descrito anteriormente à programação fetal determina o perfil de saúde e das doenças que irão acometer o indivíduo ao longo de sua vida. Barker et al (1989) observaram que em um grupo de 5.654 homens, que há relação entre o baixo peso ao nascer e a ocorrência de doenças coronarianas, o que levou os autores a interpretar que o ambiente fetal seria um novo componente na etiologia das doenças cardiovasculares. Forsdahl, (2002) também sugeriu que o ambiente fetal e pós natal poderia ser considerado um fator-chave na a etiologia de doenças cardiovasculares na vida adulta em indivíduos de uma cidade da Noruega.

A hipertensão arterial é uma das principais alterações na prole decorrentes da restrição proteica gestacional. Ratas prenhes alimentadas com dieta pobre em proteínas em três períodos gestacionais (0-7, 8-14 e 15-22), originaram prole com pressão arterial elevada após o desmame (LANGLEY-EVANS et al., 1996). Um dos mecanismos envolvidos na gênese da hipertensão arterial pela programação fetal está relacionado à superexposição fetal a glicocorticóides (LANGLEY-EVANS et al., 1996) (Figura 2). Fisiologicamente, a concentração de glicocorticóides na mãe é maior que no feto, mantendo-o protegido da exposição excessiva à este hormônio graças à ação da enzima placentária 11-β hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (11-βHSD-2), o qual possui a finalidade de atuar como barreira bioquímica evitando que os corticóides maternos acessem o compartimento fetal, convertendo o esteróide bioativo (corticosterona) em seu metabólito inativo, 11-deidrocorticosterona (LANGLEY-EVANS et al., 1995; DODIC et al., 2002; LASAITIENE et al., 2006). Estudos feitos por Stewart et al (1995) sugerem que no final da gestação, a atividade dessa enzima em ratas submetidas a restrição proteica é menor quando comparado ao controle, expondo os fetos a altas concentrações de glicocorticóides. Esses estudos corroboram o trabalho de Benediktsson et al (1993) no qual ao utilizarem um glicocorticóide sintético (Dexametasona) em ratas prenhes, observaram que a prole apresentou redução do peso ao nascer e elevação da pressão arterial sanguínea com 140 dias de vida. Além disso, Langley-Evans (1997), utilizou carbenoxolona (inibidor da 11-βHSD-2) durante toda prenhez de ratas e observou que a prole nasceu com baixo peso e desenvolveu hipertensão após 4 semanas de vida.
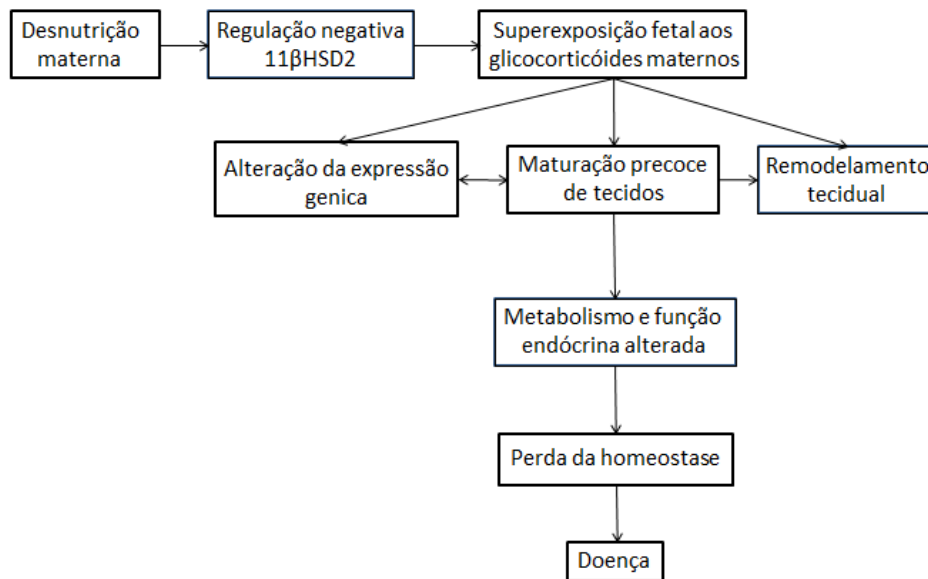
Figura 2. A superexposição fetal a glicocorticóides maternos tem papel central na programação por desnutrição. A expressão e/ou atividade reduzida da enzima 11-βHSD-2 pode provocar alterações morfo-funcionais. Adaptado de Langley-Evans, (2009).

A hipertensão é uma das principais consequências da programação fetal por restrição proteica. Os rins são órgãos que exercem importante papel no controle da pressão arterial, sendo que alterações na estrutura destes podem ser responsáveis pelo desenvolvimento da hipertensão (MESQUITA et al., 2010).

Brenner et al (1988), foram os primeiros a sugerir a hipótese de que o baixo peso ao nascimento poderia estar associado à redução no número de néfrons, o qual seria um dos fatores envolvidos na gênese da hipertensão. Esta hipótese também foi baseada no conhecimento de que a perda de néfrons gera hipertrofia compensatória dos glomérulos remanescentes, e consequentemente hiperfiltração glomerular a fim de sustentar a função renal. No entanto essa hiperfiltração seria uma adaptação que em longo prazo causaria danos ao funcionamento dos glomérulos, perpetuando um ciclo vicioso de perda de néfrons (BRENNER et al., 1988; ZANDI et al., 2006).

Zymanyi et al (2000), submeteu ratas a restrição proteica por um período que compreende duas semanas antes do acasalamento até duas semanas após o nascimento dos filhotes, a fim de se garantir a nefrogênese completa e após isso observou que a prole com quatro semanas de vida, apresentou baixo peso ao nascer, menor volume renal e redução de aproximadamente 30% no número de néfrons.

Até o momento ainda não são totalmente compreendidos os fatores envolvidos na gênese dessa redução de néfrons, entretanto alguns mecanismos foram propostos:

- Modulação pelo Sistema Renina Angiotensina Aldosterona (SRAA) – a atividade do SRAA durante o período de nefrogênese provoca modificações renais que podem futuramente gerar aumento da pressão sanguínea. Essa evidencia foi proposta por Woods & Rasch, (1998) que ao bloquear o SRAA durante períodos críticos do desenvolvimento renal, observaram diminuição do número de glomérulos e posteriormente desenvolvimento de hipertensão na prole.
- Apoptose no metanefro - A prole de ratos submetidos a restrição proteica gestacional apresentou aumento de apoptose no metanefro. Tem sido sugerido que tal aumento pode ser devido à redução de fatores antiapoptóticos (Pax-2 ou Bcl-2) e/ou aumento dos fatores pró-apoptóticos (Bax e p53) (WELHAM et al., 2002).
- Modificações na expressão de GDNF (*glial cell derivated nuclear fator*) - O GDNF é secretado pelas células do mesênquima metanefrogênico e se liga à tirosina quinase Ret (c-RET) no broto do ureter para que ocorram outro brotamentos. Camundongos com deficiência homozigota para GDNF apresentam disgenesia renal severa e morrem logo após o nascimento, enquanto camundongos heterozigotos têm rins menores com número 30% menor de néfrons, desenvolvendo hipertensão espontânea e glomerulomegalia com o tempo (CULLEN-McEWEN et al., 2003).

1.3 - Obesidade

Estudos recentes sugerem que a programação fetal por restrição de alimentos pode ser um fator predominante na epidemia da obesidade (DESAI et al., 2007). Vickers et al (2003), demonstraram que a prole de ratos que sofreram desnutrição durante toda a gestação nascem com baixo peso e apresentam risco aumentado para desenvolver obesidade na vida adulta, possivelmente por alterações ocorridas no desenvolvimento de estruturas relacionadas ao controle do apetite.

A obesidade tem se tornado uma epidemia mundial sendo caracterizada pelo Índice de Massa Corporal (IMC) igual ou superior a 30kg/m². Estima-se que no mundo, mais de 1 bilhão de adultos apresentam sobrepeso (IMC maior que 25kg/m²). No Brasil uma parceria realizada pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) e o Ministério da Saúde, demonstrou que 12,5% dos homens e 16,9% nas mulheres apresentam obesidade. Com a crescente industrialização e o estilo de vida moderno dos

últimos tempos, o acesso a alimentos ricos em gorduras e carboidratos tem mudado o hábito alimentar da população. As mudanças dos hábitos alimentares estão diretamente relacionadas ao crescimento populacional, sedentarismo, estresse, e principalmente a redução do tempo disponível para se alimentar (ABESO, 2010).

Hábitos alimentares adquiridos na infância/adolescência perduram no tempo, mantendo-se durante a vida adulta, sendo um fator determinante no estado de saúde do individuo, aumento o risco de desenvolvimento de doenças crônicas (MOREIRA, 1993). Dados epidemiológicos indicam que 30% da população européia apresenta sobrepeso e obesidade, sendo que esse percentual vem aumentando drasticamente na população jovem (BAPTISTA, 2006). Um estudo epidemiológico entre os anos 2009-2010 demonstrou que aproximadamente 17% dos jovens americanos de 12 a 19 anos apresentam obesidade (OGDEN et al., 2012).

No Brasil, a Pesquisa sobre Orçamentos Familiares (POF) realizados em pareceria do IBGE com o Ministério da Saúde, analisando dados de 188 mil brasileiros entre os anos de 2008-2009, mostrou que a obesidade e o sobrepeso têm aumentado rapidamente nos últimos anos em todas as faixas etárias. O estudo demonstrou que 21,7% dos meninos e 19% das meninas de 10 a 19 anos apresentam sobrepeso, sendo que destes, 6% dos meninos e 4% das meninas foram classificados como obesos. Os resultados foram mais preocupantes entre a faixa etária de 5 a 9 anos, onde 34,8% dos meninos e 32% das meninas estavam com sobrepeso, sendo que destes, 16,6% dos meninos e 11,8% das meninas foram considerados obesos (ABESO, 2011). A alimentação rica em lipídios está relacionada ao aumento na incidência de doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, obesidade, hipertensão arterial e dislipidemias (PARKER, 1993; MONTELL, 2001).

A maioria dos lipídios é derivada ou possui ácidos graxos (AG) na sua estrutura. Os AG são classificados pelo comprimento da cadeia de carbono, pela presença e número de duplas ligações na cadeia de carbono. Assim os AG podem ser divididos em saturado e insaturados, além de colesterol. Os AG saturados podem ser divididos em dois grupos: cadeia média (entre 8 e 12 átomos de carbono na cadeia) e cadeia longa (acima de 14 átomos de carbono). Após a absorção intestinal, os de cadeia média são transferidos para a circulação sanguínea. São transportados ligados à albumina, pela veia porta, diretamente para o fígado onde são metabolizados, não sendo responsáveis pelo aumento do colesterol sérico (SANTOS et al., 2013).

Após a absorção, os AG de cadeia longa são esterificados nos enterócitos, formando os triglicérides; são então transportados pelos quilomícrons no sistema linfático e em seguida na corrente sanguínea. Os triglicérides dos quilomícrons são hidrolisados pela lipoproteína lípase, liberando os ácidos graxos para os tecidos, onde são re-esterificados, formando novamente os triglicérides, forma de armazenamento da gordura no organismo (SANTOS et al., 2013).

Diante de uma grande quantidade de energia proveniente dos carboidratos obtidos da alimentação, ocorre aumento da secreção de insulina. Após a ligação da insulina aos receptores, 80% das células do corpo aumentam a captação de glicose, especialmente as células dos tecidos musculares, adiposo e hepático. Nos intervalos das refeições a concentração de glicose sanguínea começa a diminuir e ocorre uma série de eventos o que faz com que o fígado libere glicose para a circulação sanguínea (GUYTON & HALL, 1997; MOON et al., 2010). Quando a quantidade de glicose que entra nas células do fígado é maior do que a quantidade que pode ser armazenada como glicogênio, ou utilizada no metabolismo local dos hepatócitos, a insulina promove a conversão de todo o excesso de glicose em ácidos graxos. Com o aumento da utilização de glicose pelos tecidos do corpo, diminui a utilização da gordura. Ácidos graxos são subsequentemente transportados através do sangue na forma de triglicérides e como lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), para o tecido adiposo e depositados como gordura (GUYTON & HALL, 2002).

1.4 - O tecido adiposo e as vias inflamatórias

O tecido adiposo é um tipo especial de conjuntivo onde se observa predominância de células adiposas (adipócitos). Durante anos o tecido adiposo foi considerado o órgão de armazenamento de energia mais importante do organismo, sendo que o excesso de energia consumido é convertido em moléculas de triacilgliceróis (TAG) sob ação da insulina. Além da função de armazenamento de energia o tecido adiposo possui outras funções como proteção contra choques mecânicos, isolante térmico do organismo e preenchimento de espaços entre tecidos mantendo certos órgãos em suas posições normais (JUNQUEIRA & CARNEIRO 2004).

Nos mamíferos, existem dois tipos de tecido adiposo: unilocular (também conhecido como tecido adiposo branco) e multilocular (conhecido como tecido adiposo marrom). O adipócito branco maduro armazena os TAG em uma única e grande gota lipídica que ocupa de 85-90% do citoplasma e empurra o núcleo e uma fina camada de

citosol para a periferia da célula. Os adipócitos brancos maduros são células grandes, muitas vezes maiores que eritrócitos, fibroblastos e células do sistema imune e podem alterar acentuadamente seu tamanho (volume e diâmetro) conforme a quantidade de TAG acumulada (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

O tecido adiposo multilocular é especializado na produção de calor (termogênese) e, portanto participa ativamente na regulação da temperatura corporal. Em seres humanos adultos os depósitos de tecido adiposo marrom estão praticamente ausentes, mas são encontrados em fetos e recém-nascidos. As suas células apresentam grande número de mitocôndrias que, por não possuírem o complexo enzimático necessário para a síntese de adenosina trifosfato (ATP), utilizam a energia liberada pela oxidação de metabólitos, principalmente AG para gerar calor (CANNON & NEDERGAARD, 2004; ALANIZ et al., 2006).

O tecido adiposo produz vários fatores inflamatórios e de crescimento que podem estar envolvidos no desenvolvimento de doenças em obesos. O papel dos adipócitos em disfunções metabólicas tem sido estudado há algum tempo, porém seu papel em processo inflamatório é um conceito relativamente novo. No entanto trabalhos recentes indicam que os adipócitos compartilham certas propriedades com células imunes, como por exemplo, a ativação do sistema complemento e a produção de citocinas pró-inflamatórias (WISSE, 2004; BASTARD et al., 2006; SUN et al., 2012).

O termo adipocina é hoje empregado para qualquer proteína que pode ser sintetizada e secretada por adipócitos, sendo que já se sabe que a produção de adipocinas está aumentada na obesidade. Exemplos de adipocinas são: leptina, fator de necrose tumoral α (TNF-α), interleucina 6 (IL-6) e resistinas. Outras adipocinas, tais como angiotensinogênio, inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1) ou a visfatina também são importantes para os vasos sanguíneos e na regulação do metabolismo (TRAYHURN & WOOD, 2004). Ao contrário, a concentração de adipocinas anti-inflamatórias como adiponectina, encontra-se diminuída em obesos (GUEDES et al., 2010).

O fator nuclear kappa β (NF-kβ) é um dos principais grupos de proteínas reguladoras gênicas que induzem a síntese de citocinas pró-inflamatórias em adipócitos, estando estas envolvias no desenvolvimento de disfunção endotelial e falência renal (CINDIK et al., 2005). Dados indicam que a obesidade é caracterizada por infiltrado de macrófagos no tecido adiposo branco, que pode ser um fator importante na produção de citocinas pró-inflamatórias produzidas localmente, entretanto a perda de peso foi

associada à redução na infiltração de macrófagos e melhoria do perfil inflamatório (BASTARD et al., 2006).

Uma das características do tecido adiposo é a pouca vascularização e o fluxo é diminuído em indivíduos obesos. A expansão do tecido adiposo em indivíduos obesos faz com que os adipócitos se afastem dos vasos sanguíneos e ocorra um quadro de hipóxia (CINTI et al., 2005; TRAYHURN & WOOD, 2005). Estudos sugerem que o início da hipóxia estimula a libertação de citocinas inflamatórias, quimiocinas e fatores angiogênicos como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) de forma a aumentar o fluxo sanguíneo e estimular a vascularização, além de capacidade de atrair e reter macrófagos (CINTI et al., 2005; CINDIK et al., 2005). O fator induzido por hipóxia (HIF-1) desempenha papel fundamental na transdução da resposta metabólica à hipóxia. Durante o quadro de hipóxia o HIF-1 é aumentado pela estimulação da expressão da subunidade α (CINTI et al., 2005).

1.5 - Obesidade e hipertensão arterial

A relação entre obesidade e hipertensão é bem estabelecida tanto em adultos como em crianças. Estudos em animais e seres humanos têm elucidado os mecanismos pelos quais a obesidade induz a hipertensão arterial. Segundo Kotsis et al (2010) o tecido adiposo (adipocinas e citocinas) é um dos responsáveis pela gênese da hipertensão em indivíduos obesos.

A hipertensão arterial associada à obesidade pode ainda comprometer a natriurese pressórica, secundária à maior reabsorção de sódio. Os mecanismos que parecem estar envolvidos no comprometimento da natriurese pressórica estão relacionados à hiperatividade do sistema nervoso autônomo simpático, aumento da pressão intratubular, anormalidades estruturais dos rins, disfunção endotelial e à ativação do SRAA (KOTSIS et al., 2010). Alguns estudos tem demonstrado que o tecido adiposo possui a capacidade de sintetizar todos os componentes do SRAA, e o aumento na quantidade de tecido adiposo pode ser um fator preponderante para o aumento na concentração de Angiotensina II (ANG II) (PAULA et al., 2006; KOTSIS et al., 2010).

Estudos realizados em animais normotensos e animais espontaneamente hipertensos demonstraram que a dieta hiperlipídica provoca alterações na função renal, sendo que essa se inicia após disfunção endotelial, progredindo então para um quadro de hipertensão e obesidade, que induz resposta inflamatória com possível rompimento da

barreira de filtração glomerular (KNIGHT et al., 2008). Além disso, Wang et al (1996) demonstraram que o consumo de dieta hiperlipídica está associada à diminuição da taxa de filtração glomerular, aumento da pressão arterial, aumento das concentrações de creatinina plasmática e maior reabsorção de sódio.

1.6 – Nefrotoxicidade lipídica

Em condições metabólicas normais, quando a ingestão calórica e a utilização de calorias estão bem equilibradas, os triglicérides tendem a se acumular nos adipócitos. O desequilíbrio desse balanço pode levar ao acúmulo de gordura em outros tecidos (SAKHAEE, 2009). Os triglicérides além de se acumularem em tecidos adiposos podem também se acumular em tecidos não adiposos como músculos, fígado, rins, pâncreas e coração (VAN-HERPEN & SCHRAUWEN-HINDERLING, 2008). Esse processo de redistribuição de gordura é denominado lipotoxicidade, sendo que alguns estudos têm demonstrado relação entre obesidade e doença renal crônica, onde a lesão celular é principalmente devida ao acúmulo de ácidos graxos não esterificados e seus metabolitos tóxicos no citoplasma de células, podendo levar a disfunção ou morte celular. (VAN-HERPEN & SCHRAUWEN-HINDERLING, 2008; SAKHAEE, 2009; BOBULESCU, 2010).

Um dos primeiros trabalhos a delinear a hipótese da nefrotoxicidade lipídica foi o de Moorhead et al (1982) propondo que a dislipidemia pode contribuir para a progressão da doença renal, devido a perda de albumina na urina, levando então ao aumento compensatório na síntese hepática de lipoproteínas, o que de fato poderia ser parte de um ciclo de feedback positivo causando lesão renal adicional. Efeitos da obesidade sobre o sistema renal em animais experimentais e em humanos incluem adaptações estruturais e funcionais que repercutem no aumento da taxa de filtração glomerular e do fluxo sanguíneo (KAMBHAM et al., 2001). Em um estudo realizado em 6618 amostras de biopsias renais feitas entre os anos de 1986 a 2000, foi observado aumento de dez vezes na incidência de glomerulopatias associadas à obesidade, sendo que as principais alterações glomerulares encontradas foram glomeruloesclerose segmentar e focal, aumento do volume de glomérulos e fusão podocitária (KAMBHAM et al., 2001).

Glomérulos e túbulos renais (particularmente túbulos proximais) parecem ser os mais suscetíveis ao acúmulo de lipídios. As disfunções e lesões celulares ocorrem através de vários mecanismos, incluindo a geração de espécies reativas de oxigênio,

danos em múltiplas organelas, interrupção de vias de sinalização intracelular e liberação de fatores pró- inflamatórios e pró-fibróticos (BOBULESCU, 2010).

1.7 - Fibrose renal mediada pela ANG II

A fibrose renal é caracterizada pelo acúmulo de fibroblastos e proteínas da matriz extracelular (principalmente colágeno do tipo I) e juntamente à perda da funcionalidade dos néfrons, representa a principal característica patológica na doença renal crônica de diversas etiologias incluindo inflamação e distúrbios hemodinâmicos e metabólicos (EDDY & NEILSON, 2006; KIMURA & IWANO, 2009; ZEISBERG & NEILSON, 2010). A ocorrência de doença renal crônica vem aumentando em todo o mundo e embora sua progressão seja multifatorial (HARRIS & NEILSON, 2006; RUSTER & WOLF, 2006; PERICO et al., 2008) a ANG II parece ser um fator chave envolvido na fibrose renal (Figura 3) (RÜSTER & WOLF, 2011).

A visão clássica da ANG II como agente vasoativo envolvido na regulação hemodinâmica sistêmica e local tem sido ampliada devido às suas propriedades de citocina morfogênica, que atua ativamente na patologia renal (KLAHR et al., 1995; MEZZANO et al., 2001). A ANG II foi descrita há duas décadas como estimulante da hipertrofia de células tubulares e do aumento da secreção de colágeno (WOLF & NEILSON, 1990; WOLF et al., 1991). Tem sido demonstrada a associação da ANG II com o fator de transformação do crescimento β (TGFβ), uma citocina fibrogênica e anti-inflamatória que atua na patofisiologia na doença renal (SHARMA & ZIYADEH, 1994; ROSENBLOOM et al., 2010). A ANG II estimula tanto a transcrição quanto a síntese de TGFβ, particularmente TGFβ1, em células de túbulo proximal e induz aumento na expressão de receptores específicos para TGFβ, levando ao aumento de sua ação fibrogênica (WOLF et al., 1993; WOLF et al., 1995; WOLF et al., 1999). Tem sido demonstrado que a ANG II estimula a proliferação de fibroblastos renais em cultura e aumenta a expressão de RNAm que codifica TGFβ, fibronectina e colágeno tipo I (KAGAMI et al., 1994). Subsequentemente o TGFβ estimula maior acumulo de matriz e inflamação (WOLF et al., 1992; KAGAMI et al., 1994; WOLF et al., 1996; RUIZ-ORTEGA & EGIDO, 1997; WOLF, 2000; IWANO et al., 2002; SANCHEZ-LOPES et al., 2009).

Os principais efeitos da ANG II ocorrem via associação a dois receptores específicos AT1r e AT2r (DANIELS et al., 2007). AT1r é responsável pela maioria dos efeitos da ANG II promovendo proliferação, inflamação e fibrose (LAN et al., 2003;

LIU et al., 2003). Embora o papel de AT2r não seja totalmente compreendido, tem sido demonstrado o seu envolvimento na inibição do crescimento celular no recrutamento de células inflamatórias no rim (RUIZ-ORTEGA et al., 2001; LAN et al., 2003; HIGUCHI et al., 2007; SAKAI et al., 2008; WENZEL et al., 2010). Entretanto, alguns trabalhos têm demonstrado que AT2r também tem efeito pro-inflamatório estando envolvido na promoção de fibrose e hipertrofia (CARVAJAL et al., 2008; WENZEL, 2008; RUSTER et al., 2009).
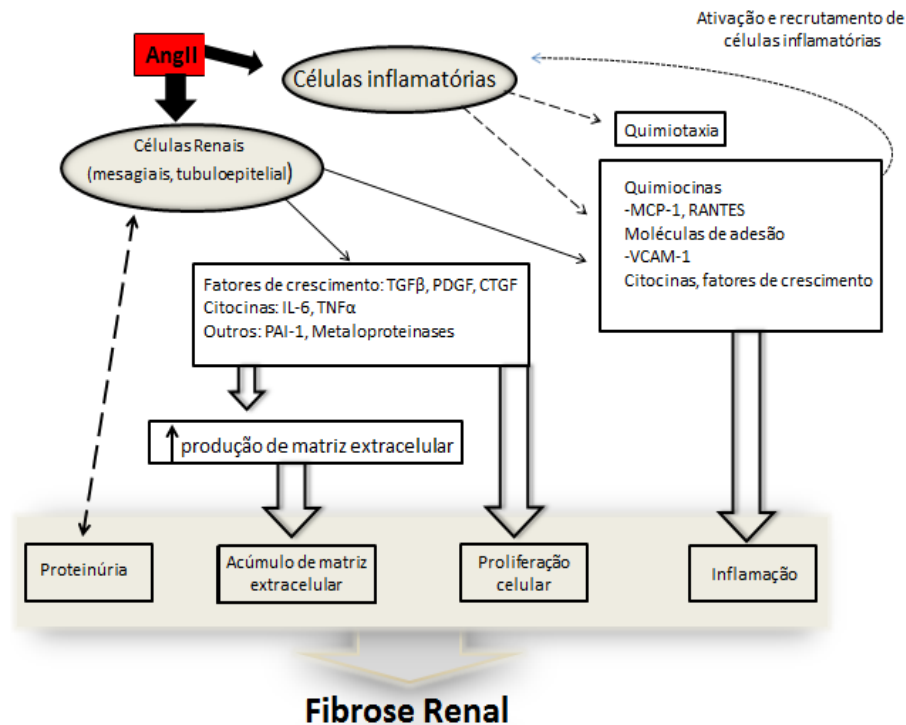
Figura 3. Envolvimento da angiotensina II na fibrose renal. Adaptada de Mezzano et al (2001).

Até o momento são conhecidos 2 subtipos do receptor AT1; 1) AT1-α que se localiza predominantemente nos vasos sanguíneos, pulmões, coração e quando ativados estão relacionados à resposta vasoconstritora da ANG II; 2) AT1-β, que é encontrado principalmente nas glândulas adrenais e hipófise e cuja ativação está relacionada à secreção hormonal e controle osmótico mediado pela ANG II (El-SABBAN et al., 2000). Quando a ANG II se liga no subtipo β do receptor AT1 encontrado no córtex das adrenais, ocorre síntese e liberação do aldosterona (GUYTON & HALL, 1997). A aldosterona é um mineralocorticóide que nos rins atua nas células do túbulo contorcido distal e do ducto coletor, tendo como efeito principal o aumento da capacidade de reabsorver sódio (ZATS, 2011).

Além de regular o equilíbrio hidroeletrolítico, a aldosterona está envolvida no quadro de fibrose renal por ativar moléculas que resultam em acumulo anormal de proteínas como o TGFβ-1 e fibronectina (GORDON & BLODE, 2008; CHEN et al., 2013).

2 - JUSTIFICATIVA

Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa verificou que em ratos com 16 semanas de vida submetidos à restrição proteica durante toda a gestação ocorreu aumento da pressão arterial a partir de 12 semanas de vida, paralelo a isso foi encontrado uma redução do número de néfrons em aproximadamente 27% sem alteração da taxa de filtração glomerular (MESQUITA et al., 2010). Alem disso também foi observado aumento da área de filtração, hipertrofia podocitária e alterações funcionais como redução da excreção urinária de sódio e maior reabsorção de sódio na região proximal dos néfrons (MESQUITA et al., 2010). Seguindo o mesmo delineamento experimental Sene et al (2013), observou aumento glomerular da expressão de TGFβ-1 fibronectina, desmina e ZEB-2, associado a redução de miR-200a, miR141 e miR-429 em glomérulos isolados de animais com 16 semanas de vida submetidos a restrição proteica gestacional.

Em outro trabalho realizado em nosso laboratório observamos que ratas submetidas a dieta hiperlipídica apresentavam redução da taxa de filtração glomerular e excreção urinária de sódio, além de proteinúria e aumento da expressão de TGFβ-1, colágeno tipo 1, fibronectina e ZEB2, acompanhado de redução da expressão de E-caderina (PINHAL et al., 2013).

Portanto, baseado nos fatos descritos acima, há evidências que tanto a restrição proteica gestacional, quanto o consumo de dieta hiperlipídica causam desordens ao sistema renal isoladamente, no entanto, até o nosso conhecimento não existe trabalhos na literatura demonstrando os efeitos renais da sobrecarga calórica em animais programados por restrição proteica.

3 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo geral

O presente projeto tem como objetivo geral estudar os efeitos da sobrecarga calórica na adolescência, sobre parâmetros funcionais e morfológicos renais na prole de ratos machos, submetidos ou não a restrição proteica gestacional.

3.2 – Objetivos específicos

Estudar a repercussão da ingestão de dieta hiperlipídica na prole de machos submetidos ou não a restrição proteica gestacional a fim de se avaliar:

-possíveis alterações na pressão arterial;

-alterações morfológicas de néfrons e glomérulos;

-avaliação da função glomerular e tubular dos néfrons;

-determinação do potencial hidrogeniônico (pH) urinário;

-modificações que ocorrem em vias renais por meio de imunomarcação e expressão de proteínas vinculadas a vias inflamatórias e fibrose.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Animais e ambiente de experimentação

O estudo foi realizado na prole de fêmeas da linhagem Wistar, fornecidas pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas (Campinas-SP). O presente projeto foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu, com o protocolo nº 408. Os animais foram mantidos no biotério do departamento de morfologia do Instituto de Biociências de Botucatu, com ciclo claro/escuro de 12 horas em temperatura controlada de (23 ± 2°C) e acondicionados em caixas de polipropileno de 41 X 34 X 16 cm, com tampa de aço inox na forma de grade, forradas com maravalha autoclavada, sendo a troca das caixas e da maravalha realizadas duas vezes por semana.

4.2 - Acasalamento e confirmação da prenhez

O protocolo de acasalamento foi iniciado quando as fêmeas atingiram de 11-16 semanas de vida, em ambiente escuro, utilizando o sistema de harém (2 ou 3 fêmeas para cada macho). Para a confirmação da prenhez foi realizado lavado vaginal para observação de espermatozóides.

4.3 - Grupos e delineamento experimental

Após confirmação de prenhez, as fêmeas foram separadas individualmente em caixas com identificações respectivas ao grupo ao qual pertenciam. A partir daí passaram a ser alimentadas com ração padrão para ratos (grupo NP, n=8, ração com 17% de proteínas) ou com ração hipoproteica (grupo LP, n=8, ração com 6% de proteínas) durante todo o período gestacional (MESQUITA et al., 2010; SENE et al., 2013). Após o nascimento foram mantidos 8 animais por fêmea. As dietas eram isocalóricas e normossódicas e durante a amamentação as ratas receberam ração padrão para roedores (Tabela 1). Após o desmame até a 7ª semana de vida os machos foram alimentados com ração normal. Da 8ª a 13ª semana os animais do grupo NP (*normal protein*) foram alimentados com dieta padrão (grupo NPN, n=8, ração com 2.93 cal/g) ou dieta hipercalórica (grupo NPH, n=8, ração com 5.44 cal/g). Os animais do grupo LP *(low protein)* também foram divididos recebendo dieta padrão (grupo LPN, n=8, ração com 2.93cal/g) ou dieta hipercalórica (grupo LPH, n=8, ração com 5.44 cal/g) (Figura 4).
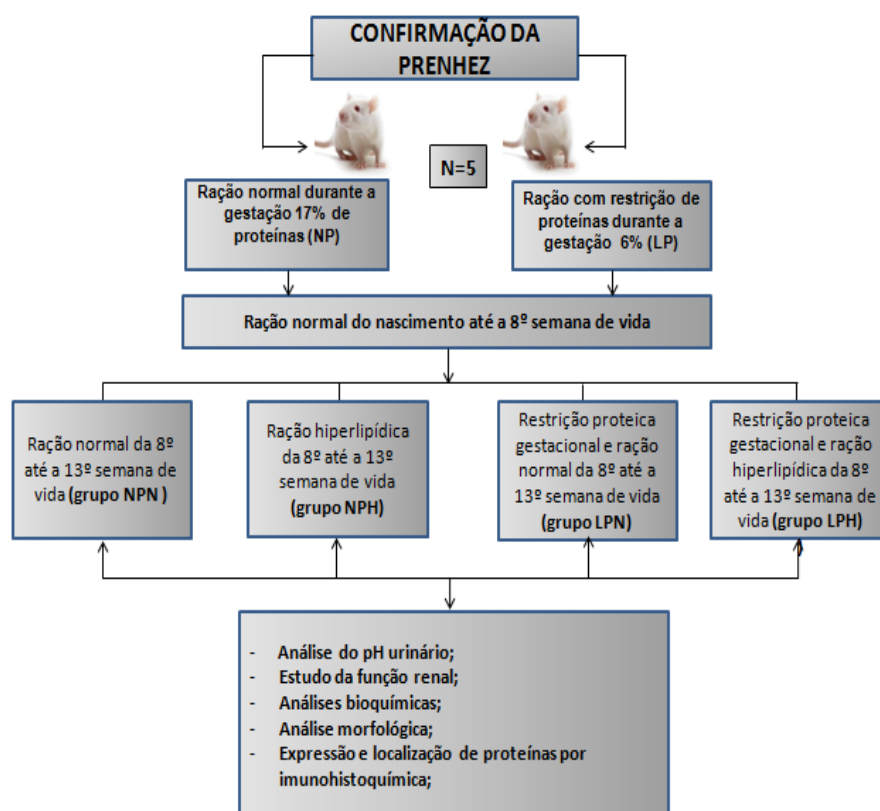
Figura 4. Representação esquemática do delineamento experimental.

Tabela 1. Comparação da composição e do total de calorias da dieta AIN 93G modificada para hiperlipídica com a dieta padrão (Nuvilab CR-1).

INGREDIENTES	Dieta Controle (g/Kg)	Dieta 60% (g/kg)
AMIDO	397,5	52
AMIDO DE MILHO DEXTRINIZADO	132	143
SACAROSE	100	66
CARBOIDRATO	**629**	**261**
CASEINA	200	271
L-CISTINA	3	3
BITARTARATO DE COLINA	2,5	2,5
PROTEINAS	**205,5**	**276,5**
OLEO DE SOJA	70	34
BANHA (gordura saturada)	___	333
GORDURAS TOTAIS	**70**	**367**
CELULOSE MICROFINA (fibra)	50	50
FIBRAS TOTAIS	**50**	**50**
MIX MINERAIS	35	35
MIX VITAMINAS	10	10
CALORIAS	**2,93 calorias/g**	**5,44 calorias/g**

4.4 – Caracterização da obesidade

O índice de adiposidade foi o critério utilizado para a caracterização da obesidade, sendo que esse fator leva em consideração a soma do peso de três depósitos de gordura (visceral + gonadal + retroperitoneal). A soma da massa desses depósitos de gordura é considerada gordura total. O índice de adiposidade é calculado pela seguinte fórmula: (GT/PT x 100), sendo GT a gordura total, e PT o peso total no dia do sacrifício.

4.5 - Determinação da pressão arterial sistólica

A pressão arterial sistólica dos animais foi aferida na 8ª, 10ª e 12ª semana de vida, utilizando o método de pletismografia de cauda. Os animais foram previamente aquecidos em caixa de madeira forrada com maravalha, contendo uma lâmpada lateral responsável pelo aquecimento do animal, durante aproximadamente 10 minutos.

Posteriormente os ratos foram acondicionados em um contentor de acrílico com a finalidade de imobilização. Para tal procedimento, a região proximal da cauda foi encaixada a um manguito ligado a um esfigmomanômetro contendo um transdutor de pulso que capta os sinais a serem enviados e registrados em computador pelo software específico (IITC - Life Science Model 29). Foram obtidos valores de três aferições e a média destes 3 foi considerada.

4.6 - Determinação do pH urinário

O pH urinário foi determinado semanalmente da 8ª a 14ª semana de vida. Os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas, após jejum sólido de 8 horas, sendo a urina coletada em um béquer contendo uma camada de vaselina líquida (Chemco) com a finalidade de evitar variações do pH. Após um período de 8 horas foi determinado o pH urinário utilizando pHmetro (Qx1500 - Qualxtron).

4.7 - Análises bioquímicas

-Dosagem de creatinina

As concentrações plasmáticas e urinárias de creatinina foram realizadas por método colorimétrico (BIOCLIN K016). No método colorimétrico, a creatinina reage com o ácido pícrico, formando um complexo de cor amarelo-avermelhado. Nesse pH ocorre a máxima formação do complexo corado creatinina-picrato, e, também com outros elementos plasmáticos. Com a adição do reagente ácido, o pH é diminuído e a cor devida à creatinina é desfeita, permanecendo a cor devida aos cromogênios. As amostras foram levadas ao espectrofotômetro (Micronal modelo 383, São Paulo, Brasil), para leitura da absorbância a 510nm.

-Perfil lipídico

Os níveis séricos de colesterol foram determinados por método enzimático-colorimétrico (BIOCLIN K-083). Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela lipoproteínas lipases, formando colesterol livre + ácidos graxos. O colesterol livre sofre ação da colesterol oxidase e se transforma em colesterol 3 ona + peróxido de hidrogênio. Esse composto, na presença da peroxidase reage com a 4 Aminoantipirina e fenol, formando um cromógeno vermelho cereja cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de colesterol. As amostras foram levadas ao equipamento automático (Cobas Mira - Roche®) para uma leitura da absorbância a 500nm. De acordo com os

valores de absorbância foram aplicados os cálculos seguindo as instruções descritas pelo fornecedor do kit diagnóstico.

Os níveis séricos de triglicérides foram determinados por método enzimático-colorimétrico (BIOCLIN K-117). As amostras foram levadas ao equipamento automático (Cobas Mira - Roche®) para uma leitura da absorbância a 500nm. De acordo com os valores de absorbância foram aplicados os cálculos seguindo as instruções descritas pelo fornecedor do kit diagnóstico.

Para determinação dos níveis séricos da lipoproteína de alta densidade (HDL), foi utilizado o método enzimático-colorimétrico (BIOCLIN K-015). As lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e os quilomícrons são precipitadas com a mistura de ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio. Após centrifugação, o colesterol ligado as moléculas de HDL, é determinado no sobrenadante por método colorimétrico enzimático. As amostras foram levadas ao equipamento automático (Cobas Mira - Roche®) para uma leitura da absorbância a 500nm. De acordo com os valores de absorbância foram aplicados os cálculos seguindo as instruções descritas pelo fornecedor do kit diagnóstico.

Finalmente os níveis séricos de colesterol LDL foram determinados pelo método enzimático-colorimétrico (BIOCLIN K-088). As amostras foram levadas ao equipamento automático (Cobas Mira - Roche®) para uma leitura da absorbância a 600nm. De acordo com os valores de absorbância foram aplicados os cálculos seguindo as instruções descritas pelo fornecedor do kit diagnóstico.

-Dosagem de sódio, potássio e lítio

As concentrações plasmáticas e urinárias de sódio, potássio e lítio foram determinadas por fotometria de chama (Micronal, B262, São Paulo, Brasil). Os metais alcalinos quando elevados a uma temperatura alta, absorvem energia da fonte de calor e passam ao estado de excitação em sua forma atômica. Quando estes átomos resfriam, voltam ao estado normal não excitado e re-emitem sua energia absorvida por radiação com comprimentos de onda específicos, alguns dos quais na região visível da luz (Na^+:589 nm, Li^+: 670 nm, K^+: 768 nm). Um metal alcalino aspirado através de uma chama de baixa temperatura, na forma nebulizada emite, depois de excitado pelo calor da chama, uma onda de frequência discreta a qual pode ser isolada por um filtro ótico. A emissão é proporcional ao número de átomos excitados e, portanto, a concentração do íon na amostra.

-Proteinúria

Para a quantificação de proteínas na urina, foi utilizado um kit (BIOCLIN - BIOPROT U/LCR) de método colorimétrico vermelho de pirogalol (apresenta a mesma sensibilidade para albumina e gama globulinas). As proteínas presentes na urina reagem com o vermelho de pirogalol e o molibdato formando um complexo de cor vermelha, com absorção máxima em 600 nm (580 - 620 nm). A intensidade de cor formada é diretamente proporcional a concentração de proteína na amostra. Para a determinação de proteinúria foi utilizado o espectrofotômetro (Micronal modelo 383, São Paulo, Brasil). De acordo com os valores de absorbância foram aplicados os cálculos seguindo as instruções descritas pelo fornecedor do kit diagnóstico, sendo o resultado da proteinúria expresso em mg/dL.

4.8 - Estudo funcional do néfron

4.8.1 – Clearance de lítio (CLi)

Para avaliação da função tubular renal foi realizado o clearance de lítio (CLi) em cada grupo. O CLi é baseado na evidencia de que a absorção do lítio no túbulo contorcido proximal ocorre na mesma proporção daquela evidenciada para o sódio e a água (THOMSEN, 1984; GARCIA et al., 1991; THOMSEN & SHIRLEY, 1997). Quatorze horas antes do início da coleta da urina, os animais receberam uma dose de cloreto de lítio a 0,06mEq/100g (Synth) administrado por gavagem, na concentração de 5% do peso corporal. Em seguida a ração foi retirada e os animais ficaram *overnight* em jejum sólido. Duas horas e vinte minutos antes do início da coleta, foram administradas por gavagem duas sobrecargas hídricas de volume igual a 5% do peso corporal, com intervalo de 60 minutos entre as aplicações. Após a segunda sobrecarga os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, e aguardado um período de 20 minutos antes de iniciar a coleta da urina em tubos de ensaio graduados para quantificação do fluxo urinário durante 120 minutos. Após o término da coleta o volume urinário foi anotado, a urina foi homogeneizada, centrifugada, e o sobrenadante congelado para dosagem.

Posteriormente os animais foram anestesiados com ketamina (75mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e foi realizada punção cardíaca para coleta de sangue. O sangue coletado foi colocado em tubos falcon com heparina, centrifugados e o plasma foi congelado para análises posteriores.

4.8.2 – Fórmulas para cálculo dos parâmetros funcionais dos néfrons

- Fluxo urinário minuto (V1)

O fluxo urinário coletado no período de 120 minutos foi dividido pelo tempo da coleta. Os resultados foram expressos em ml/min. Em nosso protocolo, o volume urinário foi corrigido pelo peso do animal sendo expresso por 100g de peso corporal. Os resultados foram expressos em μ/min/100g p.c.

-Clearance de creatinina (CCr)

O CCr foi calculado pela fórmula (UxV1/P), sendo U a concentração urinária de creatinina, V1 o fluxo urinário minuto e P a concentração de creatinina no soro. Os resultados foram expressos em μl/min/100g p.c.

-Clearance de sódio (CNa)

O CNa foi calculado pela fórmula (U x V1/P), sendo U a concentração urinária de sódio, V1 o fluxo urinário minuto e P a concentração plasmática de sódio. Os resultados foram expressos em μl/min/100g p.c

-Clearance de lítio (CLi)

Representa a depuração plasmática de lítio na unidade de tempo nos glomérulos renais, calculado pela fórmula (U x V1/P), sendo U a concentração urinária de lítio, V1 o fluxo urinário minuto e P a concentração plasmática de lítio. Os resultados foram expressos em μl/min/100g p.c.

-Clearance de potássio (CK)

Representa a depuração plasmática de potássio na unidade de tempo nos glomérulos renais, calculada pela fórmula (U x V1/P), sendo U a concentração urinária de potássio, V1 o fluxo urinário minuto e P a concentração plasmática de potássio. Os resultados foram expressos em μl/min/100g p.c.

-Fração de Excreção de Sódio (FENa):

A FENa foi calculada pela fórmula (CNa/CCr x 100), sendo CNa o clearance de sódio e o CCr o clearance de creatinina. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

-Fração de excreção de Potássio (FEK):

A FEK foi calculada pela fórmula (Ck/ CCr x 100), sendo Ck o clearance de potássio e o Ccr o clearance de creatinina. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

-Fração de excreção proximal de sódio (FEPNa):

A FEPNa foi calculada pela fórmula (CLi/CCr x 100), sendo CLi o clearance de lítio e o CCr o clearance de creatinina. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

-Fração de excreção pós-proximal de sódio (FEPPNa):

A FEPPNa foi calculada pela fórmula (CNa/CLi x 100), sendo CNa o clearance de sódio e o CLi o clearance de lítio. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

4.9 – Imunohistoquímica

Animais quando completaram 14 semanas de vida foram anestesiados com ketamina (75mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e o nível de anestesia foi avaliado através de reflexos da córnea. Após laparatomia medial, os rins foram coletados e colocados em solução de paraformoldeído a 4% overnight. Ao retirar da solução fixadora o material foi lavado com solução salina em tampão fosfato 0.1M pH 7.4 (PBS), e posteriormente armazenado em álcool 70%. O material foi desidratado através de soluções com gradiente crescente de álcool (80%, 90%, 95%, 100%), diafanizado em xilol e embebido em paraplast (Sigma) para inclusão e a formação dos blocos.

Os rins foram cortados a 5 µm em Micrótomo (Leica RM2245), e coletados em lâminas silanizadas. As lâminas foram desparafinizadas em xilol I, II, III e álcool-xilol por 5 minutos cada. Posteriormente elas foram hidratadas através de solução decrescente de álcool (100%, 95% e 70%) e em seguida lavadas com PBS por 3 vezes de 5 minutos. A recuperação antigênica foi feita com tampão citrato 0,01M pH 6,0 em panela de pressão por 25 minutos. Após a recuperação antigênica as laminas foram novamente lavadas em PBS por 3 vezes e foi feito o bloqueio da peroxidase endógena com 10 ml de peróxido de hidrogênio e 90ml de metanol por 10 minutos em câmara escura. Após o bloqueio da peroxidase as laminas foram lavadas em PBS 3 vezes por 5 minutos, e foi bloqueado com solução bloqueadora (PBS + leite Molico 5%) por 60 minutos em temperatura ambiente.

Após bloqueio as lâminas foram incubadas *overnight* com os seguintes anticorpos primários AT1r (diluição 1:500, Santa Cruz Biotechnology, sic-1173), TGF-β1 (diluição 1:200, Santa Cruz Biotechnology, sic-146) e fibronectina (diluição, 1:300 Abcam, AB23750). Na manhã seguinte, os cortes foram lavados 3x por 5 minutos e posteriormente incubados com anticorpo secundário conjugado à peroxidase por 2 horas. Após 2 horas, as lâminas foram lavadas 3x por 5 minutos e incubadas com DAB (3,3'-diaminobenzidina) por 5 minutos. Posteriormente foram contra coradas com hematoxilina, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e finalmente montadas com permount para adesão das lamínulas.

4.10 - Quantificação de colágeno pela técnica de picrossírius

O procedimento do preparo da lâmina se iniciou pela desparafinização e hidratação dos cortes igual como ocorre no processamento histológico de imunohistoquímica. Seguindo, foi realizada citoquímica pelo Picrossírius intercalando ácido pícrico (13 minutos), picrossírius (aproximadamente 30 segundos), ácido pícrico (2 minutos). As lâminas foram lavadas rapidamente em água destilada e posteriormente desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e finalmente montadas com permount para adesão das lamínulas.

Nesta técnica as fibras colágenas se coram de vermelho, e os demais tecidos em amarelo. Para análise foi realizado captura das imagens através de um computador e uma câmera acoplado a um microscópio Leica contendo seu respectivo software (Leica Qwin 3.1 para Windows). Foram efetuadas 10 medidas automáticas (detecção automática da cor vermelha pelo software) utilizando-se objetiva 20x, em 10 campos microscópicos da região cortical, de no mínimo 5 animais por grupo.

4.11 - Microscopia eletrônica de varredura

Os rins foram coletados e foi extraída uma fatia de aproximadamente 2 mm do córtex e desprezada. Da porção restante foi retirada uma fatia de aproximadamente 3 mm de espessura, que foi excisada em cubos de aproximadamente 1 x 1 mm que foram mantidos em solução de glutaraldeído 2,5%. Após lavagens em tampão fosfáto 0.1M pH7.4 durante 1 hora, os espécimes foram pós-fixados em solução de OsO_4 1% (em tampão fosfato) a 4ºC, no escuro, por 2 horas e então imersos em solução de sacarose 2.3M onde permaneceram *overnight*. Os espécimes foram imersos em nitrogênio líquido, fraturados, lavados na mesma solução tampão, desidratados em série de solução

com gradiente crescente de acetona e secos no ponto-critico modelo (Leica CPD030). Após identificação das superfícies fraturadas os espécimes foram montados em *stubs*, cobertos com ouros durante 120 segundos no sputter coater modelo (SCD050, Bal-Tec), posteriormente foram examinados e fotografados em microscópio eletrônico de varredura (Quanta 200 – Fei Company) operado a 10 kV. O processamento do material bem como a captação de imagem foram feitos no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu.

4.12 - Análise estatística dos resultados

A análise estatística empregada foi a Análise de Variância (ANOVA One-Way) com Post-hoc pelos Testes de Bonferroni ou Newman-Keuls. Os resultados foram expressos como média ± Desvio Padrão (SD). Em todos os cálculos foi fixado nível crítico de 5% ($p<0.05$).

5- RESULTADOS

5.1 – Peso dos rins

Com 14 semanas de vida os animais do grupo LPN apresentaram aumento do peso renal e os animais dos grupos que receberam dieta hiperlipídica apresentaram rins com massa reduzida. Assim, houve diferença significativa no peso dos rins direitos (Figura 5A) quando comparamos LPN com estes grupos. Já nos rins esquerdos a diferença só foi significativa quando comparamos os grupos NPH e LPN (Figura 5B).
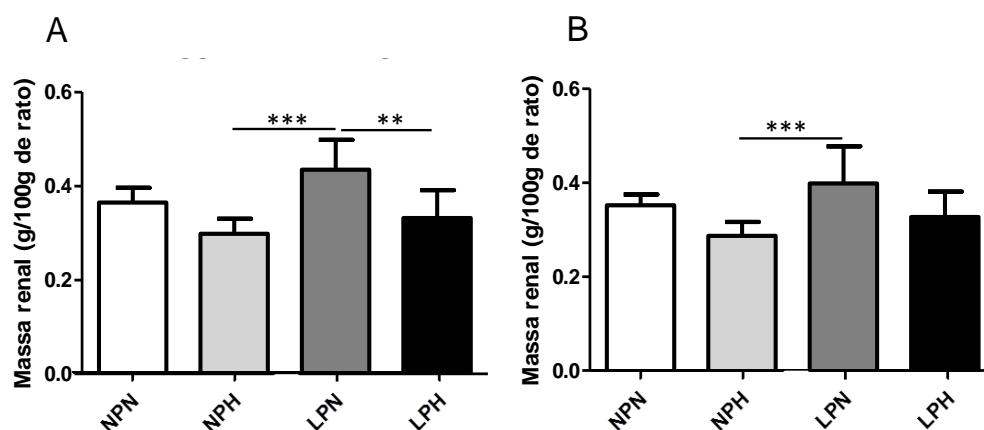
Figura 5. Peso dos rins direitos (A) e esquerdos (B) em animais de 14 semanas de vida. Valores expressos em média ± SD. (n=6 por grupo, de 6 mães diferentes). ** P<0.001; ***P<0.0001.

5.2 - Índice de adiposidade

Com 14 semanas de vida os animais submetidos à dieta hiperlipídica (NPH e LPH) apresentaram aumento significativo do índice de adiposidade. Já o grupo LPN, apresentou redução significativa deste índice (Figura 6).
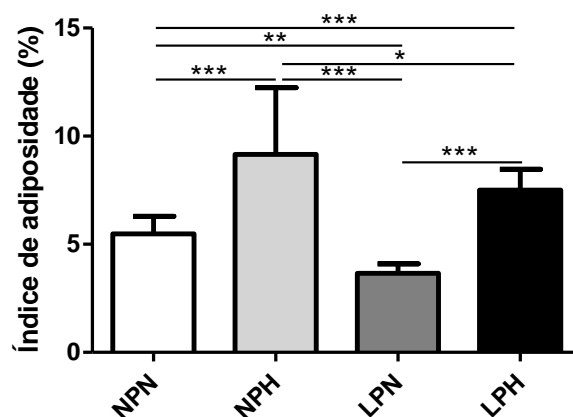
Figura 6. Índice de adiposidade em animais de 14 semanas de vida. Os dados representam a média ± SD. (n=8 por grupo de 8 mães diferentes).*P<0.05; **P<0.001; ***P<0.0001.

5.3 – Perfil lipídico

As concentrações séricas de colesterol aumentaram significativamente nos animais que receberam a dieta hiperlipídica quando comparadas àquelas encontradas nos animais controle. Embora a diferença não tenha sido significativa, a concentração de triglicérides também aumentou nestes animais. A concentração de HDL foi significativamente menos nos animais do grupo LPH comparativamente ao grupo NPN. Quanto ao LDL observamos uma tendência de aumento, porém não significativa (Figura 7).
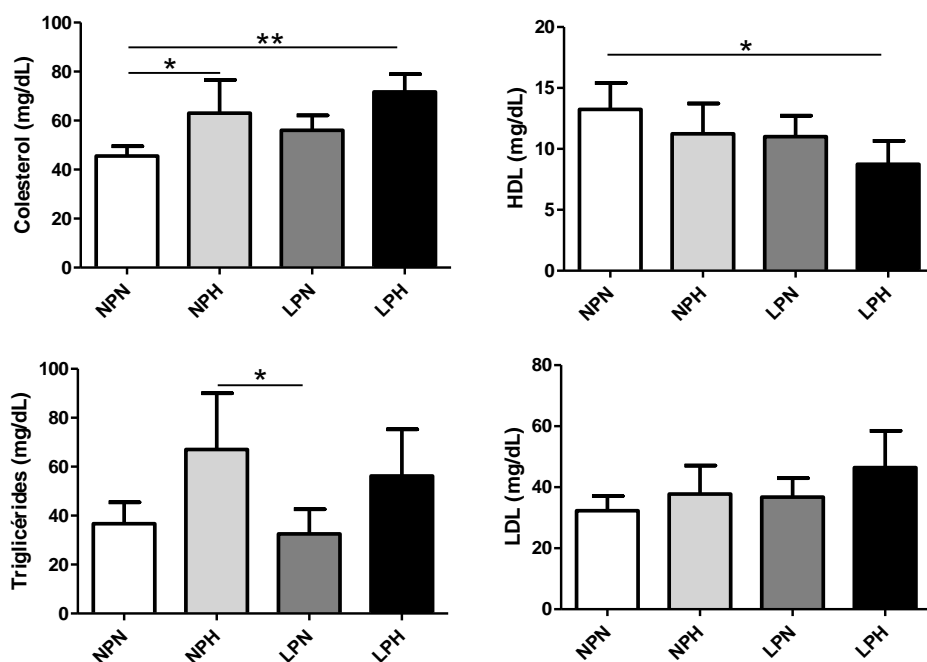
Figura 7. Análises bioquímicas do soro de animais de 14 semanas de vida. Os dados representam a média ± SD(N= 5 por grupo, de 5 mães diferentes). *P<0.05; **P<0.001.

5.4– Volume e pH urinários

Não foram observadas alterações significativas no volume urinário dos animais. Quanto ao pH urinário observamos que a partir da 3º semana de dieta hiperlipídica, houve redução significativa do pH nos animais que consumiram dieta hipoproteica, quando comparados aos grupos que receberam dieta normal (Figura 8). Assim, independente de ter sofrido restrição proteica gestacional ou não o fator determinante para a redução do pH urinário foi a dieta rica em gorduras. Entretanto verificamos redução mais acentuada do pH urinário nos animais LPH comparativamente à observada nos NPH (Figura 8).
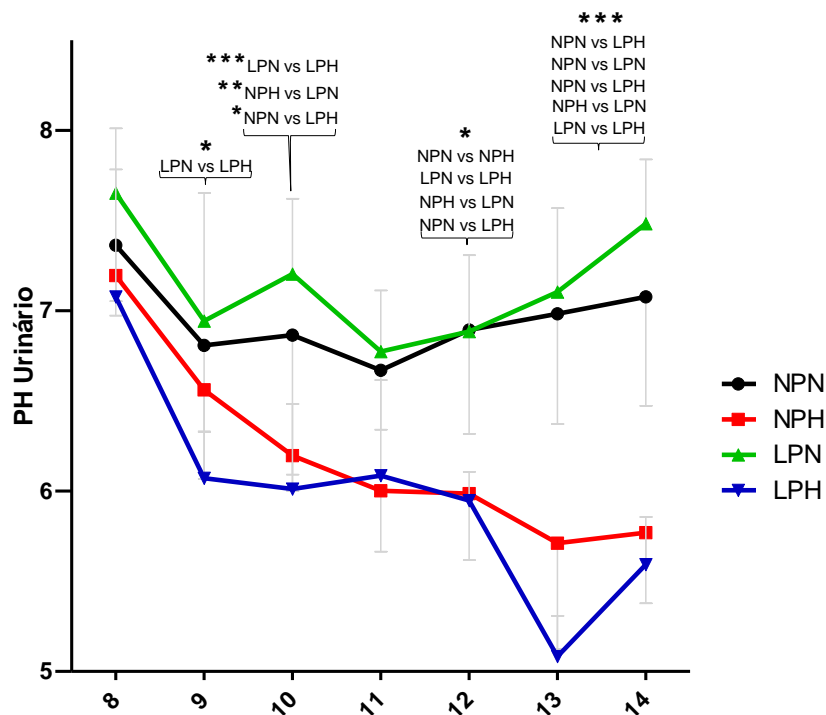
Figura 8. pH urinário aferido durante as 6 semanas de dieta hiperlipídica. Os resultados são expressos em média ± SD (n=5 de 5 mães diferentes). *P<0.05; **P<0.001; ***P<0.0001.

5.5 - Pressão arterial sistólica

Os animais programados por restrição protéica gestacional apresentaram elevação significativa na pressão arterial, a partir da 10º semana de vida, sendo mais acentuado nos animais que receberam dieta hiperlipídica. Na 12ª semana o grupo LPN manteve a pressão observada na 10ª enquanto que nos LPH houve aumento significativo na 14ª em relação à 10ª semana. Na 12ª semana o grupo NPH também apresentou aumento significativo dos valores pressóricos comparativamente ao controle (Figura 9).
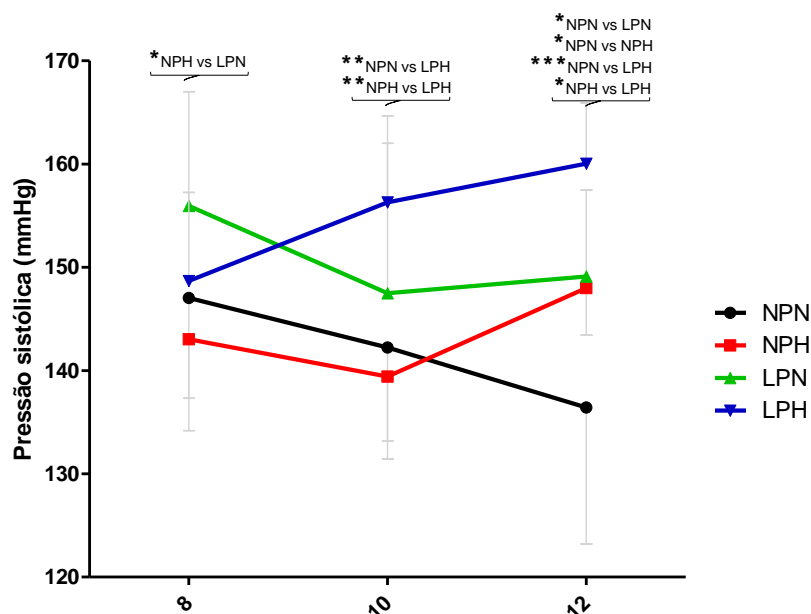
Figura 9. Pressão arterial sistólica aferida da 8ª a 12ª semana de vida. Os resultados estão expressos como média ± SD (N=8 por grupo, de 8 mães diferentes).*P<0.05; **P<0.001; ***P<0.0001.

5.6 – Estudo funcional do néfron

Para avaliar a função glomerular foi realizado o clearance de creatinina (CCr) que representa a depuração plasmática da creatinina por unidade de tempo pela totalidade dos glomérulos renais funcionais. Embora tenha havido redução da filtração glomerular no grupo LPH, não observamos diferenças significativas entre os grupos. Observamos redução significativa da depuração de sódio nos grupos NPH, LPN e LPH quando comparados ao controle. Assim houve redução significativa da natriurese nestes animais. Pela $FEPNa^{+}$ pudemos constatar que a queda da natriurese ocorreu pela redução da capacidade reabsortiva de sódio do túbulo proximal, sendo esta significativa nos grupos NPH e LPH comparativamente ao controle. Não observamos alterações significativas na excreção de potássio e nem na função pós-proximal quanto à manipulação de sódio (Figura 10).
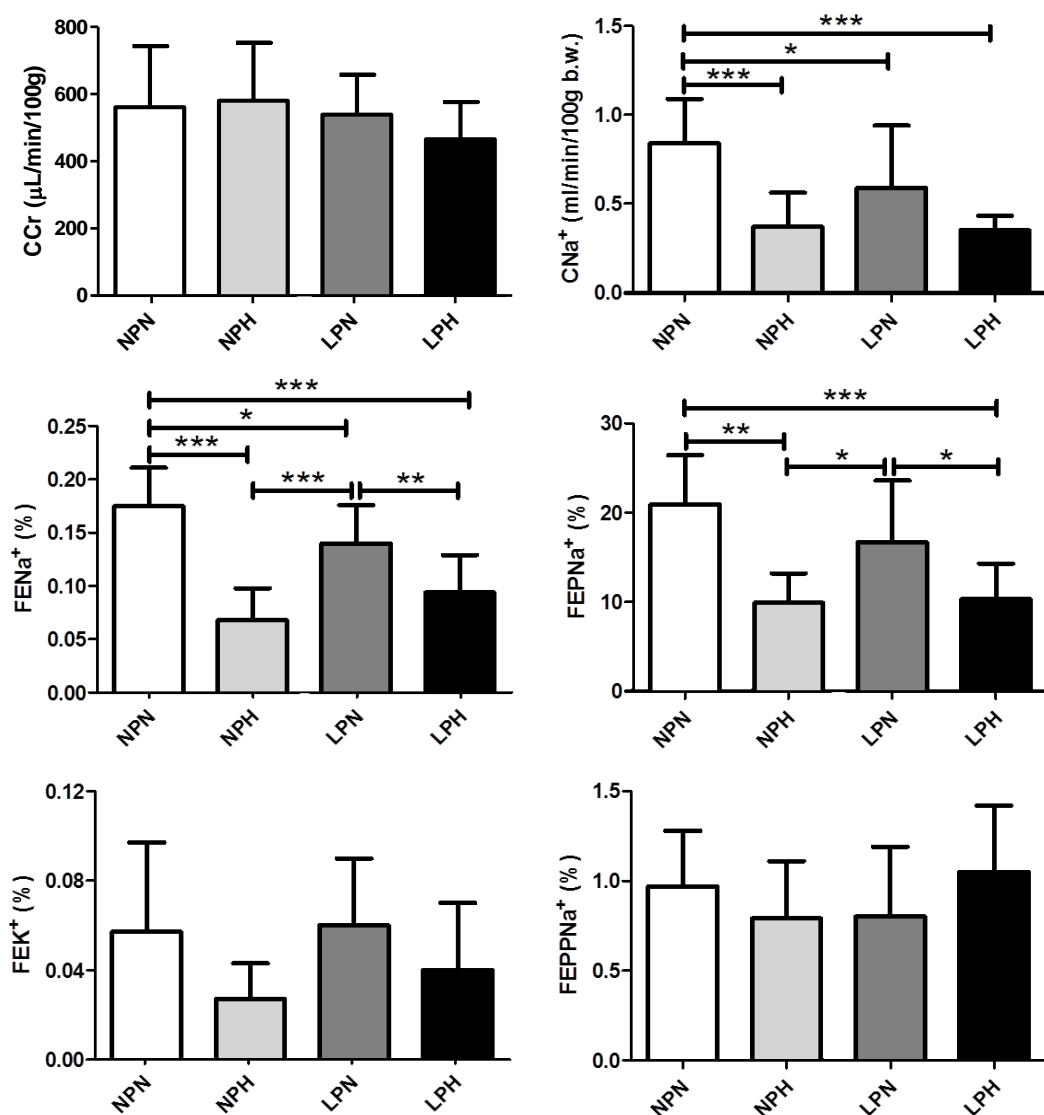
Figura 10. Clearance de creatinina (CCr), clearance de sódio (CNa^+), fração de excreção de sódio ($FENa^+$), fração de excreção proximal de sódio ($FEPNa^+$), fração de excreção pós-proximal de sódio ($FEPPNa^+$) e fração de excreção de potássio (FEK^+) em animais de 14 semanas de vida. Os resultados são expressos em média ± SD (N=8, de 8 mães diferentes). * P<0.05, ** P<0.001, *** P<0.0001.

5.7- Imunohistoquímica

Nos animais do grupo controle a imunomarcação nos corpúsculos renais de AT1r ocorre, predominantemente, nas arteríolas e, nos glomérulos, aparece dispersa e de pouca intensidade (Figura 11E). Já nos grupos tratados ocorreu aumento na expressão deste receptor por todo o glomérulo (Figura 11F-H). Também em corpúsculos renais, observamos aumento no conteúdo de fibronectina glomerular nos animais tratados (Figura 11B-D) comparativamente àquele observado nos controle (Figura 11A). Este aumento foi mais evidente nos animais do grupo LPH.
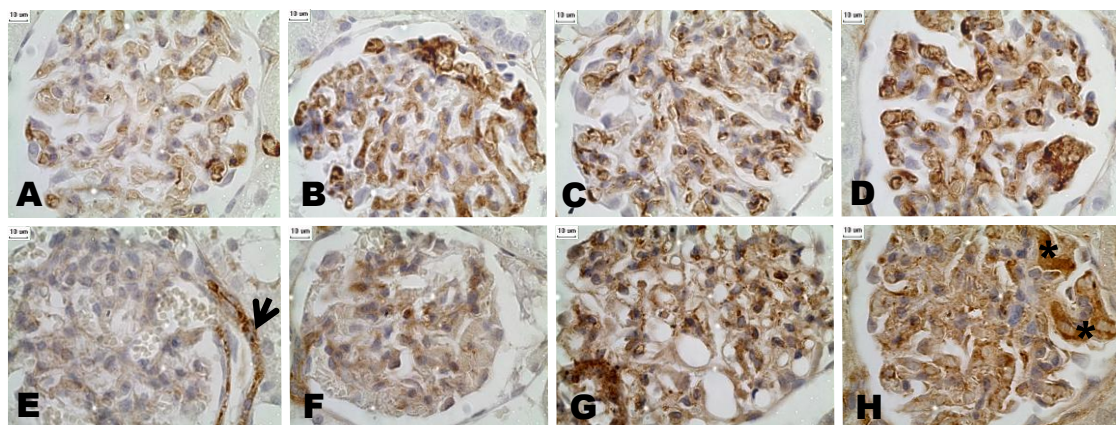
Figura 11. Imunohistoquimica para fibronectina (A-D) e AT1r (E-H) em glomérulos de animais de 14 semanas de vida. Em A observamos localização normal de fibronectina em animais controle (NPN). Nos animais dos grupos NPH (B) e LPN (C) observamos marcação aumentada e o aumento é mais evidente nos animais do grupo LPH (D). Em E observamos o padrão de marcação de AT1r (NPN), predominantemente na parede da arteríola (seta). Nos animais do grupo NPH (F) observamos aumento pontual de marcação diferentemente do observado nos animais dos grupos LPN (G) e LPH (H) onde observamos marcação em todo o glomérulo. Alguns podócitos apresenta-se repletos de AT1r (*).

Considerando todo o parênquima cortical, observamos o receptor AT1 na superfície apical das células dos túbulos proximais além da presença já citada, na parede vascular (Figura12A). Nos animais do grupo LPH observamos localização citosólica além da presença em vasos e porção apical tubular (Figura 12B). Nos animais dos grupos LP observamos aumento de AT1 tubular (Figura 12 C e D). Quanto a região medular observamos redução na marcação de AT1r nos animais submetidos à dieta hiperlipídica (Figura 12E-H).
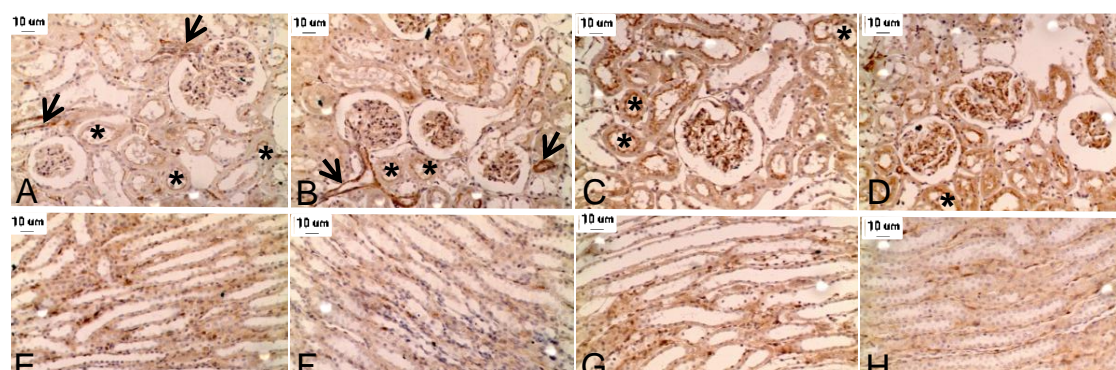
Figura 12. Imunohistoquímica para receptor AT1 em rins de animais com 14 semanas de vida. Na porção cortical dos animais controle (A), observe a localização vascular (seta) e na porção apical de túbulos proximais (*). Nos animais submetidos à dieta hiperlipídica (B) observamos localização tubular tanto

apical quanto citosólica. Nos animais submetidos à restrição proteica gestacional (C) apenas e naqueles que também foram submetidos à dieta hiperlipídica (D) observamos marcação mais intensa comparativamente à observada no controle. Em D observe a desorganização da citoarquitetura tecidual. Na porção medular observamos discreta redução na marcação nos grupos que receberam dieta hiperlipídica (NPH em F e LPH em H) comparativamente aos que não receberam esta dieta (NPN em E e LPN em G).

Considerando todo o estroma cortical observamos aumento na expressão de fibronectina nos espaços peri-tubulares nos grupos NPH e LPN e mais intenso em LPH (Figura 13D). O Mesmo foi observado na porção medular (Figura 13E-H).
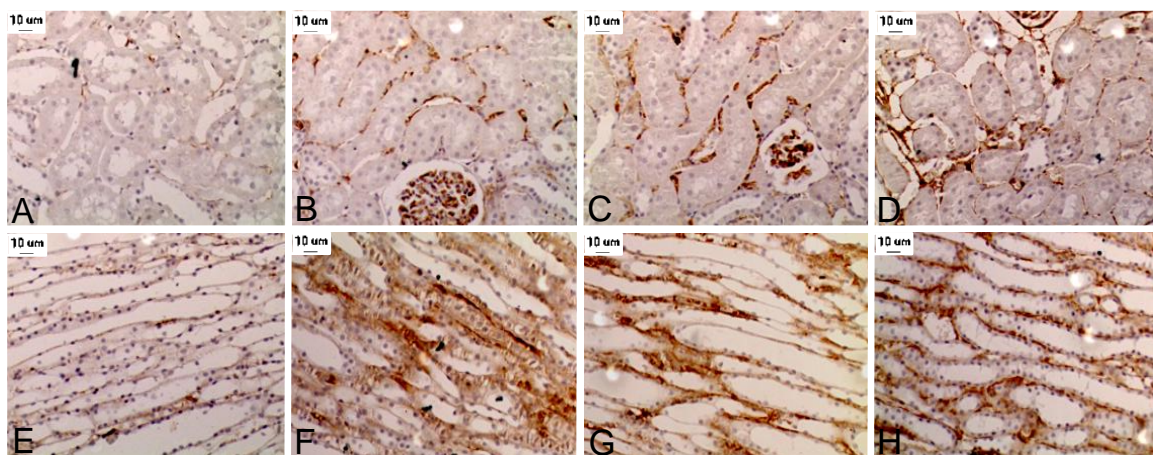
Figura 13. Imunohistoquímica para fibronectina em rins de animais com 14 semanas de vida. Tanto na porção cortical (A-D) quanto na medular (E-F) observamos aumenta na concentração de fibronectina nos animais dos grupos NPH (B e F), LPN (C e G) e LPH (D e H) comparativamente àquela observada nos animais controle (A e B).

A expressão cortical de TGFβ1 aumentou nos animais submetidos a dieta hiperlipídica (Figura 14 A-D). Já na porção medular (Figura14E-H) observamos expressão aumentada nos grupos NPH e LPN.
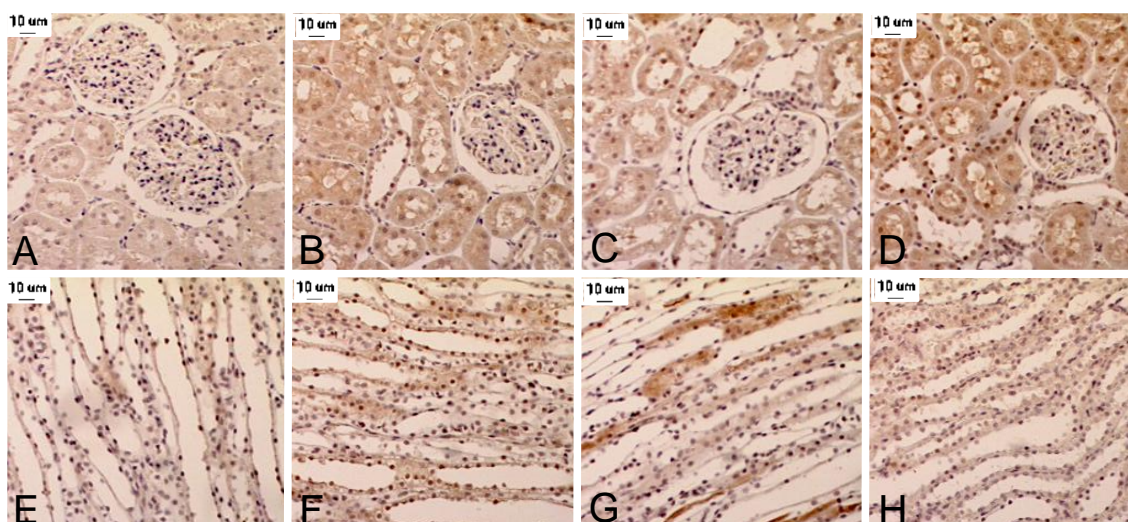
Figura 14. Imunohistoquímica para TGFβ1 em rins de animais com 14 semanas de vida. Na região cortical (A-D) os animais dos grupos NPH (B) e LPH (D) apresentaram expressão aumentada desta proteína comparativamente àqueles dos grupos NPN (A) e LPN (C). Nos animais LPH, observamos discreto aumento na marcação glomerular (D). Já na medula (E-H), observamos aumento nos grupos NPH (F) e LPN (G) comparativamente à obtida nos grupos controle (E) e LPH (H).

5.8 – Quantificação de colágeno pela técnica de picrossírius

A Figura 15 exemplifica os resultados obtidos pela técnica de picrossírius. Após quantificação observamos que o estroma cortical dos animais experimentais apresentou aumento significativo ($p<0.0001$) de colágeno em relação ao observado nos animais controle (NPN). A área ocupada pelo colágeno no grupo NPN foi de 4%, enquanto que o grupo NPH apresentou 7%, o grupo LPN 8% e o grupo LPH 9% (Figura 16).
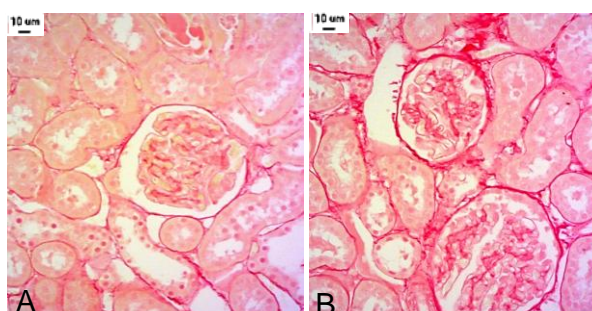
Figura 15. Cortex renal de animais de 14 semanas de vida submetidos à técnica de picrossirius. Os animais do grupo LPH (B) apresentaram estroma com aumento do conteúdo colagênico comparativamente ao observado nos animais controle (A).
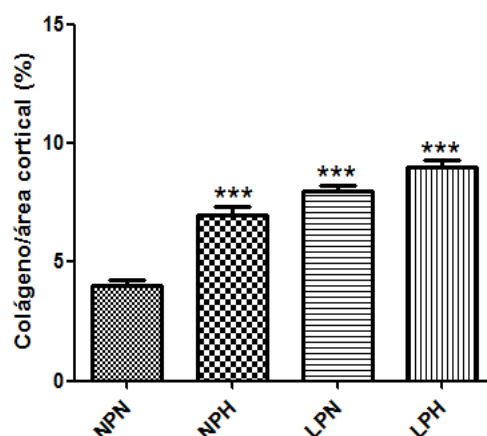
Figura 16. Quantificação de colágeno na região cortical renal. Resultados estão expressos como média ± EPM. *** P<0.0001.

5.9 – Microscopia eletrônica de varredura

Pela técnica de microscopia eletrônica de varredura observamos glomérulos de animais do grupo NPN, com 14 semanas de vida, apresentando morfologia normal (Figura 17). Já nos animais do grupo LPN esta técnica nos permitiu observar achatamento e simplificação podocitária. Além disso, alguns podócitos apresentaram rompimento da membrana plasmática (Figura 18). Nos animais do grupo NPH foi observado achatamento dos podócitos e dos prolongamentos primários e secundários e perda das interdigitações dos pedicelos. Em algumas regiões verificamos aglomerados proteicos e vesiculares na superfície dos glomérulos (Figura 19). Nos animais do grupo LPH, as alterações foram muito mais severas se comparadas àquelas observadas nos grupos descritos anteriormente. A maioria dos podócitos apresentou grandes áreas de rompimento da membrana plasmática o que provavelmente, resultou em maior quantidade de aglomerados proteicos e vesiculares na superfície dos glomérulos. Algumas porções dos tufos de capilares apresentaram-se desnudas sem a presença de pedicelos. Verificamos ainda o rompimento de capilares glomerulares (Figuras 20 e 21).
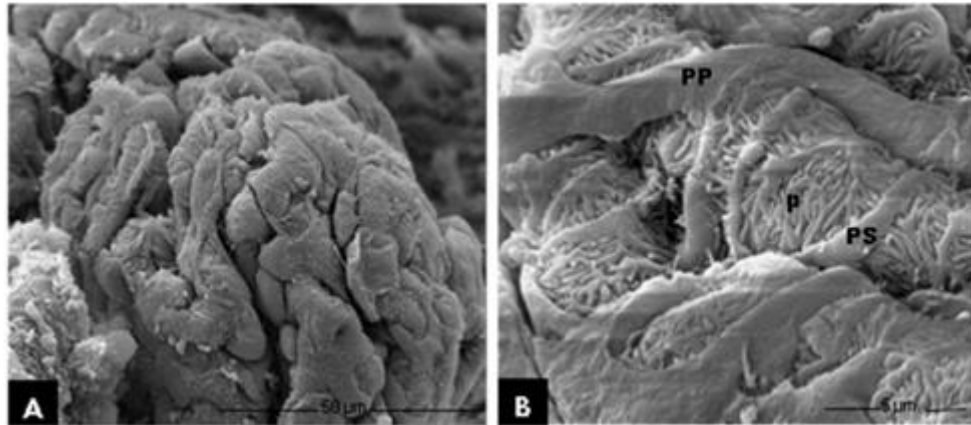
Figura 17. Fotomicrografias de glomérulos de animais de 14 semanas do grupo NPN obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Em A podemos observar a ultraestrutura normal do tufo de capilares glomerulares recoberto pelo epitélio visceral da cápsula do Bowman. Em B temos um detalhe que nos permite observar os prolongamentos primários (PP), secundários (PS) e os pedicelos (p) dos podócitos. Repare na integridade das fendas de filtração formadas pelas interdigitações de pedicelos.
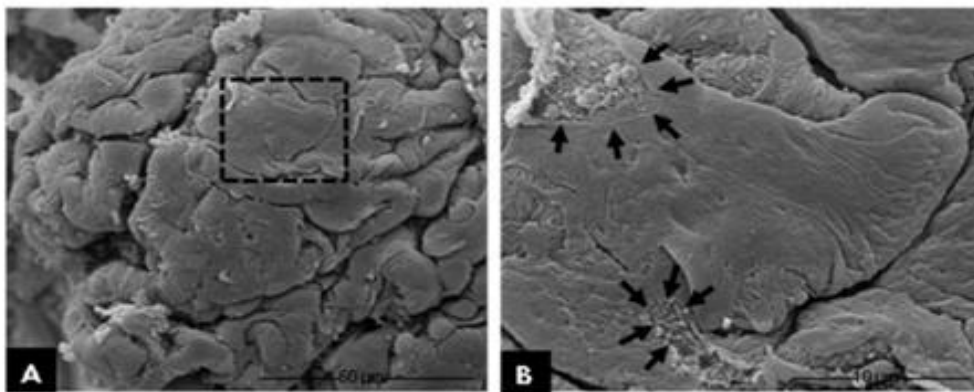
Figura 18. Fotomicrografias de glomérulos de animais de 14 semanas do grupo LPN obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Em A temos uma vista geral onde é evidente o achatamento dos podócitos. Em B temos a região demarcada pelo quadrado pontilhado em A em maior aumento. Observe as áreas delimitadas pelas setas onde ocorreu rompimento da membrana do podócito. Parece ter havido um estiramento da membrana que resultou em áreas esgarçadas.
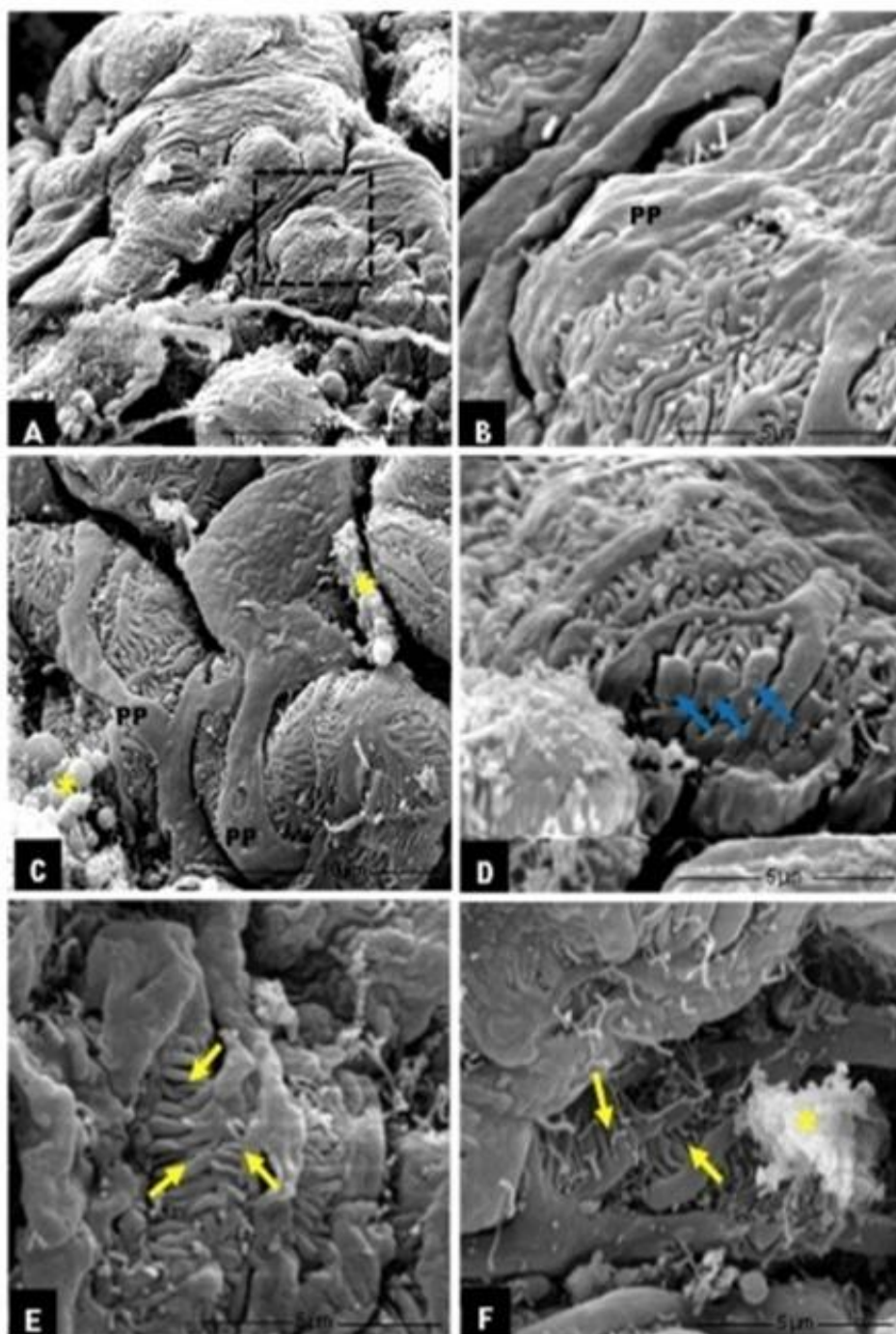
Figura 19. Fotomicrografias de glomérulos de animais de 14 semanas do grupo NPH obtidas por microscopia eletrônica de varredura**.** Em A temos uma vista geral onde é evidente o achatamento dos podócitos. Em B temos a região demarcada pelo quadrado pontilhado em A em maior aumento. Observe o achatamento do corpo celular e do processo primário (PP) dos podócitos. Em C e F podemos observar acúmulos de material proteináceo e vesicular (asteriscos amarelos). Em D temos pedicelos dilatados (setas azuis) e em E e F podemos constatar a perda de integridade das fendas de filtração glomerulares pela perda da adesão dos pedicelos (setas amarelas).
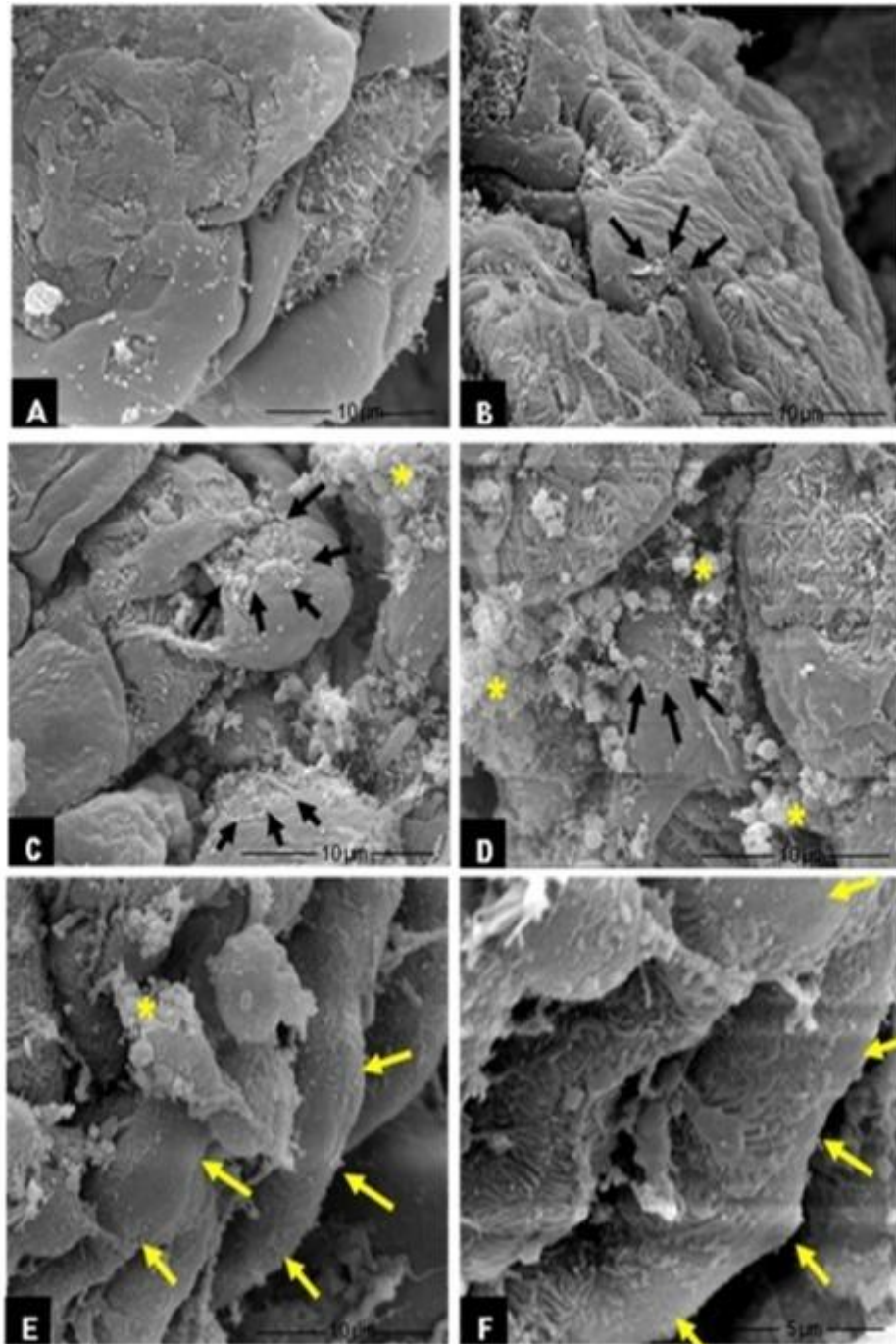
Figura 20. Fotomicrografias de glomérulos de animais de 14 semanas do grupo LPH obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Em A temos a visão de diversos podócitos achatados. Observe as áreas de perda de membrana plasmática (setas pretas em B, C e D) que provavelmente resultou no acúmulo de grande quantidade de depósitos amorfos e vesiculares (asteriscos amarelos em C, D e E) na superfície glomerular. Em E e F temos áreas de capilares glomerulares desnudos (setas amarelas).
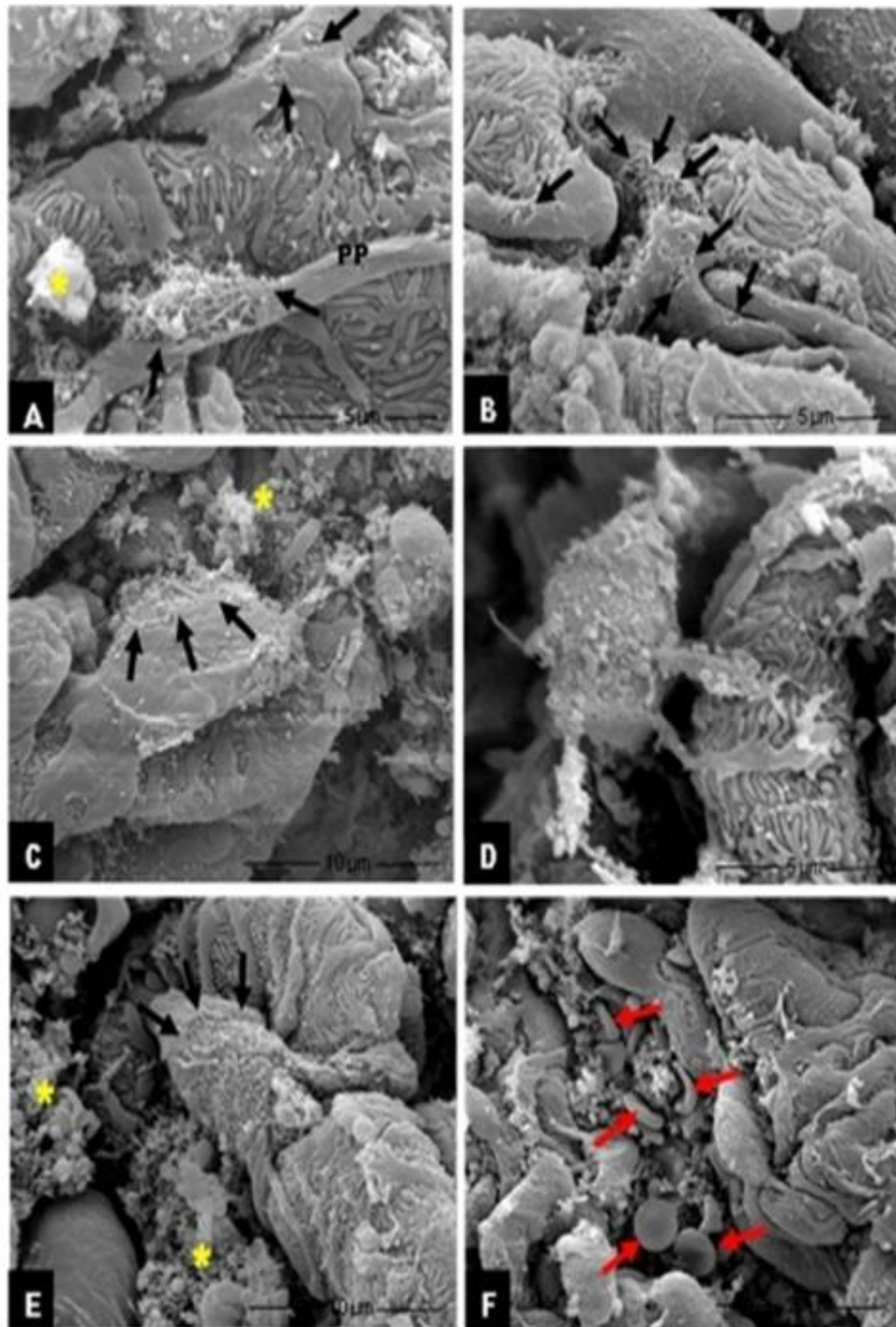
Figura 21. Fotomicrografias de glomérulos de animais de 14 semanas do grupo LPH obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Em A podemos observar um processo primário (PP) cuja membrana foi rompida exibindo a trama elaborada de elementos do citoesqueleto. As setas pretas indicam áreas extensas de perda de membrana e os asteriscos amarelos o material disperso, provavelmente organelas e outros constituintes citosólicos dos podócitos rompidos. Observe em D um podócito totalmente desnudo. Em F, temos a imagem de um capilar glomerular rompido exibindo hemácias (setas vermelhas) e outros constituintes.

5.10 – Proteinúria

A proteinúria refere-se à quantidade de proteína que é filtrada e eliminada pela urina, servindo como parâmetro para avaliar a progressão da doença renal. Como se pode observar na (Figura 22) os animais dos grupos NPH e LPN apresentaram valores significativamente maiores de proteína na urina quando comparado ao controle (NPN), demonstrando que tanto a programação fetal quanto o consumo de dieta hiperlipídica elevam isoladamente a concentração de proteínas na urina. Quando essas duas situações foram associadas (LPH) observamos aumento maior ainda e altamente significativo (p<0.0001) de proteinúria, sendo significativo contra todos os outros grupos.
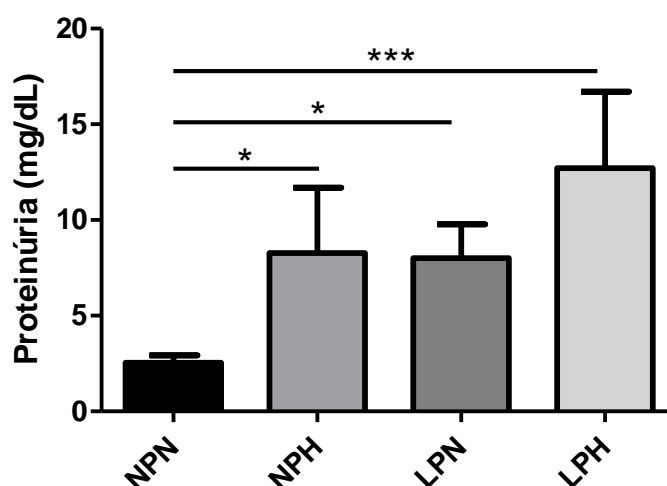
Figura 22- Proteinúria em animais de 14 semanas de vida. Os resultados estão expressos como média ± SD (n=5 por grupo de 5 mães diferentes).*P<0.05; ***P<0.0001.

6- DISCUSSÃO

A hipótese da programação fetal provocada por um ambiente intrauterino inadequado e acarretando em aumento na susceptibilidade tardia para desenvolver doenças metabólicas e cardiovasculares, tem sido evidenciada por inúmeros trabalhos (ARMITAGE et al., 2004; HOWIE et al., 2009). Esta hipótese foi proposta por Barker e colaboradores que verificaram a associação entre hipertensão, resistência a insulina e dislipidemias em adultos cujo ambiente intrauterino foi inapropriado gerando crescimento fetal desproporcional (BARKER, 1995; GODFREY et al., 1997).

Este trabalho analisou os efeitos renais da sobrecarga lipídica, durante 6 semanas, em animais programados ou não por restrição proteica gestacional.

O peso dos rins dos animais que sofreram restrição proteica e dieta hiperlipídica foi muito pouco alterado. Marchand & Langley-Evans (2001) demonstraram que em ratos submetidos ao modelo de programação nutricional por restrição proteica, o tamanho do rim é pouco afetado pelo insulto nutricional, mas o número de néfrons é reduzido em até 30%.

O índice de massa corporal (IMC, relação entre a altura ao quadrado e o peso corpóreo) é um dos critérios utilizados em humanos para definir a obesidade. Entretanto, segundo Thibault et al (2004) este critério não é válido para modelos experimentais. Assim, alguns dos critérios utilizados para a determinação de obesidade em animais de laboratório levam em consideração os depósitos de gordura visceral e subcutânea, gordura corporal total e também o peso corporal (LEVIN et al., 2003; WOODS et al., 2003; THIBAULT et al., 2004). No presente estudo o critério utilizado para determinar a obesidade foi o índice de adiposidade, o qual levou em consideração a soma de três depósitos de gordura (visceral, gonadal e retroperitoneal).

A literatura mostra que a ingestão de dieta hipercalórica pode resultar em aumento nos depósitos de gordura, bem como, na massa corporal (BELLAVER et al., 2001; GAÍVA et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2008). Corroborando estes achados, os dados do presente estudo mostraram que a ingestão de dieta hiperlipídica induziu aumento significativo nos depósitos de gordura e no peso corpóreo. A eficiência alimentar e os depósitos de gorduras viscerais, gonadal e retroperitoneal mostraram-se significativamente aumentados nos ratos que receberam a dieta hiperlipídica em relação àqueles que receberam a dieta padrão. Uma vez que a eficiência alimentar reflete a relação entre energia ingerida e a energia estocada, estes resultados sugerem que a capacidade de converter kcal ingeridos em gordura é maior nos animais que receberam a dieta hipercalórica em relação aos animais que receberam a dieta padrão. Lutaif et al (2008) sugerem que o ganho de massa corporal é um mecanismo que evita a elevação da temperatura corporal (termogênese facultativa) acima daquela adequada ao funcionamento celular. De fato, a literatura mostra que a dieta hipercalórica aumenta a eficiência metabólica e alimentar no grupo obeso (LAUTERIO et al., 1998; GAÍVA et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2008). É importante salientar que os animais programados pela restrição proteica gestacional apresentaram maior susceptibilidade ao aumento de peso, quando comparados aos não programados, tendo como referência os

valores obtidos em seus respectivos controles. Isso pode ser comprovado pelo aumento maior no peso, nos estoques de gordura e no índice de adiposidade neste animas comparativamente aos não programados.

O alto consumo de gorduras é classicamente relacionado com elevação do colesterol total, colesterol LDL, triglicérides e redução do colesterol HDL. Dietas com gorduras altamente saturadas podem aumentar as concentrações sanguíneas de colesterol entre 15 a 25%, resultando em maior deposição de gordura no fígado, o que fornece quantidade aumentada de acetil-CoA às células hepáticas para formação de colesterol (GUYTON & HALL, 1997). O colesterol alimentar é um composto vital para o organismo, essencial na formação das membranas das células, na produção de hormônios sexuais, da vitamina D e de sucos digestivos, além de desempenhar papel importante na estrutura e função dos tecidos nervosos e compor os sais biliares (NELSON & COX, 2011). Estudos em diferentes populações revelaram que indivíduos com colesterol elevado, apresentam risco elevado de desenvolver aterosclerose e doença arterial coronariana (KEYS et al., 1984). A doença arterial coronariana também apresenta uma relação positiva com os níveis aumentados de triglicérides (AUSTIN et al., 1998). Outro fator importante para o desenvolvimento da aterosclerose consiste na presença de altas concentrações plasmáticas de LDL colesterol, que são aumentadas na corrente sanguínea em decorrência da ingestão de gordura altamente saturada na dieta. A fração LDL colesterol *é* sintetizada no fígado, sendo responsável pelo transporte do colesterol a partir do fígado para os tecidos periféricos (NELSON & COX, 2011). Ao contrário do LDL colesterol, a fração HDL colesterol (também sintetizada pelo fígado) é responsável pelo transporte reverso do colesterol dos tecidos ao fígado (BAYNES et al., 2007). Diante disso, concentrações elevadas de HDL colesterol reduzem a incidência de aterosclerose por conta desse transporte reverso do colesterol, e pela capacidade de absorver cristais de colesterol que estão começando a se depositar nas paredes arteriais (GUYTON & HALL, 1997).

A síndrome metabólica, a obesidade e o diabetes mellitus tipo 2 tem sido associadas a maior prevalência de litíase renal. Um dos prováveis mecanismos, se refere à diminuição do pH urinário, prejudicando a excreção de $NH4^{+}$ e consequentemente aumento de formação de cálculos renais de ácido úrico (BOBULESCU et al., 2008; SAKHAEE, 2009). A menor excreção de $NH4^{+}$ pode ter correlação com um quadro de resistência insulínica proveniente da obesidade, devido os rins possuir receptores de insulina, que quando são ativados estimulam a produção de amônio. O pH urinário mais

baixo, associado a menor excreção de $NH4^+$ e uma diminuição do volume urinário estão estreitamente relacionados a um quadro de nefrolitíase por ácido úrico (PAK et al., 2001). Além disso, estudos feitos por Cabalgante et al (2012) relacionaram a maior acidificação tubular com o fenômeno de transição epitélio mesenquimal, no qual é um fator chave para a fibrose renal.

Um dos mecanismos envolvidos na gênese da hipertensão arterial pela programação fetal está relacionado ao aumento da exposição fetal a glicocorticóides (LANGLEY-EVANS et al., 1996). Em estudos anteriores, foi observado que o baixo peso ao nascimento estaria associado a uma redução do número de néfrons, o qual seria um fator para o aumento da pressão arterial, pois a perda néfrons gera hipertrofia compensatória nos glomérulos remanescentes a fim de sustentar a função renal (BRENNER et al., 1988; ZANDI et al., 2006; MESQUITA et al., 2010). Outro fator relacionado ao aumento da pressão arterial em animais programados, são alterações nos componentes do SRAA intra-renal (MESQUITA et al., 2010; VACCARI et al., 2013).

Além da restrição proteica gestacional, a obesidade pode aumentar a pressão arterial por vários mecanismos já conhecidos. Foi demonstrado que a obesidade pode ativar o sistema nervoso autônomo simpático e elevar a pressão arterial devido a vasoconstrição periférica e aumento da reabsorção tubular renal de sódio. Há evidências demonstrando que a leptina pode ser o elo entre a obesidade e o aumento da atividade simpática (CARVALHEIRA et al., 2005). Além de seus efeitos no controle do apetite e no metabolismo, a leptina age diretamente no hipotálamo para aumentar a atividade simpática (CARVALHEIRA et al., 2005). Segundo Rahmouni et al (2005) a insulina também é capaz de aumentar a atividade do sistema nervoso autônomo simpático. Outros possíveis mecanismos podem estar envolvidos no aumento da atividade simpática na obesidade, como altos níveis de ácidos graxos livres circulantes e baixos níveis séricos de grelina e adiponectina (RAHMOUNI et al., 2005).

Os adipócitos produzem uma série de citocinas inflamatórias como IL-6, TNF-α, PCR, além de espécies reativas de oxigênio (EROs) no qual estão relacionados a disfunção endotelial (KOTSI et al., 2010). Além disso, já foi observado que na obesidade há um desequilíbrio entre agentes vasoconstritores e vasodilatadores, como o aumento de endotelina1 (ET1) e a redução de óxido nítrico (NO) (HSUEH & QUINONES, 2003; ACREE et al., 2007). O grau de disfunção endotelial é proporcional a severidade da resistência à insulina (SCHNYDER et al., 2001).

O tecido adiposo tem a capacidade de sintetizar todos os componentes do SRAA, sendo a ANG II um importante fator para desenvolvimento da hipertensão. O aumento dos níveis plasmáticos de ANG II tem sido evidenciado em humanos e animais obesos (JEUNEMAITRE et al., 1992; NIELSEN et al., 2004; ZHANG et al., 2005). A ANG II é um potente vasoconstrictor, aproximadamente 40 vezes mais potente que a noradrenalina para elevar a pressão arterial, e seus efeitos são mediados principalmente pelo receptor AT1 (GODIN & FERGUSON, 2012). O receptor AT1 é um receptor metabotrópico, ou seja, acoplado à proteína G, que estimula a fosfolipase C. A fosfolipase C, uma vez ativada, induz a formação de trifosfato de inositol, assim como de diacilglicerol, o que provoca a liberação e aumento da concentração citoplasmática de cálcio, levando à ativação da proteína quinase C e da adenil-ciclase regulada pelo receptor AT1 (GODIN & FERGUSON, 2012; CAT & TOUYZ, 2011). Esses eventos estão relacionados com as respostas fisiológicas de vasoconstrição, retenção renal de água e sódio, liberação de aldosterona e vasopressina, efeitos sobre a taxa de filtração e fluxo sanguíneo glomerular, estimulação do crescimento celular, entre outros (GUYTON & HALL, 2002; CAT & TOUYZ, 2011).

Através da imunohistoquímica, o presente estudo verificou aumento da expressão glomerular de AT1r , TGFβ -1, fibronectina e deposição de colágeno através da técnica de picrossírus, ambos intrinsecamente relacionado ao processo fibrótico. Esses resultados confirmam achados recentes indicando que os podócitos submetem-se a conversão fenotípica, caracterizada pela perda acentuada da estrutura específica e ganho de características de transição, sugerindo um processo semelhante ao de transição epitélio-mesenquimal (LI et al., 2008; PINHAL et al., 2013; SENE et al., 2013.

Estudos têm mostrado que a ANG II desempenha um papel fundamental na progressão da doença renal crônica, contribuindo para a fibrose renal. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a ANG II ativa células renais para produzir fatores pró-fibróticos e proteínas da matriz extracelular (ALEXANDER et al., 1998; VEHASKARI et al., 2004). Portanto, conforme observado em nosso estudo, houve uma relação entre o aumento da expressão de ANGII com TGFβ-1 e fibronectina em ratos submetidos a restrição proteica e em ratos que receberam dieta hiperlipídica.

Os resultados encontrados em nosso modelo experimental de restrição proteica gestacional corroboram com a hipótese de Brenner, no qual a hiperfiltração em ratos nascido com baixo peso pode levar a hipertensão glomerular e no futuro, apresenta risco aumentado de doença renal (BRENNER, 1988). O envolvimento da dieta hiperlipídica

sobre a função renal em ratos que sofreram restrição proteica gestacional ainda necessita ser elucidada. Em ratos a dieta hiperlipídica causa lesão renal que é precedida de disfunção endotelial e hipertensão, induzida pelo estresse oxidativo, resposta inflamatória e rompimento da barreira de filtração renal (LEE, 2012). O presente estudo também demonstrou redução da fração de excreção urinária de sódio no grupo LPN e mais pronunciada em NPH e LPH. A diminuição da $FENa^+$ foi acompanhada por uma queda na $FEPNa^+$ e ocorreu apesar da taxa de filtração glomerular (CCr) estar inalterada. Interessante destacar que o aumento da reabsorção de sódio foi acompanhada por aumento da concentração urinária e H^+ (redução do pH urinário), permitindo a hipótese da participação do transportador Na^+/H^+ nesse mecanismo. Embora os mecanismos da excreção urinária de sódio não sejam totalmente compreendidos, a perda da função do órgão, a atividade neural simpática e do SRAA parecem ter um papel dominante na retenção de água e sódio. O aumento de tecido adiposo característico na obesidade pode elevar os níveis de leptina, que além de regular a ingestão de alimentos, também exerce um importante papel no aumento da atividade simpática (KOTSIS et al., 2010). Os resultados demonstraram por imunohistoquímica, um aumento da expressão de AT1R em ratos tratados com dieta hiperlipídica, assim um aumento da atividade renal da angiotensina pode induzir a produção de EROs.

Especulativamente no presente estudo, as mudanças na hemodinâmica glomerular, causando diminuição do fluxo sanguíneo peritubular, podem ser responsáveis pelo aumento da reabsorção de sódio na região proximal do néfron em ratos programados. Em ratos que receberam dieta hiperlipídica, as respostas na $FENa^+$ podem ser resultado de interações de vários mecanismos, como vasoconstrição da arteríola renal mediada por ANGII, super atividade do sistema nervoso autônomo simpático e por modificações diretamente os túbulos renais.

Os resultados obtidos pela microscopia eletrônica de varredura nos permitem afirmar que a dieta hiperlipídica provoca lesões podocitárias importantes. Nos animais programados estas lesões foram muito mais severas indicando senescência precoce destas células nestes animais. A perda prematura da integridade estrutural e funcional glomerular pode estar relacionada ao aparecimento de doenças renais.

Fisiologicamente o filtrado glomerular tem composição semelhante ao plasma sanguíneo, entretanto quase não possui proteínas por dois principais motivos. O primeiro é que moléculas grandes como a albumina (principal proteína plasmática, >60kDa) tem dificuldade em atravessar a barreira de filtração glomerular e aparecem

em quantidades mínimas no filtrado. E o segundo principal motivo é que a membrana de filtração glomerular apresenta carga elétrica negativa, o que acaba repelindo as proteínas plasmáticas por terem a mesma carga, dificultando assim sua filtração (GUYTON & HALL, 1997; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). A carga negativa da membrana do podócito se deve a presença de sialoproteínas de superfície aniônica, como a podocalixina, podoplanina e podoendina (PETERMANN & FLOEGE, 2007). Entretanto algumas doenças podem aumentar a permeabilidade da membrana de filtração, como hipertensão arterial, fibrose e acumulo de lipídios, além disso, já foi constatado que a carga elétrica negativa normalmente apresentada pela membrana glomerular está reduzida ou ausente em doenças que levariam à síndrome nefrótica (GUYTON & HALL, 1997; MEZZANO et al., 2001; NAKAMURA et al., 2005; PRAGA, 2005; MESQUITA et al., 2010).

Portanto esses fatores contribuem para que as proteínas plasmáticas sejam filtradas e posteriormente excretadas na urina (GUYTON & HALL, 1997). A essa condição chamamos de proteinúria, sendo um dos mais importantes parâmetros para avaliar a lesão estrutural dos glomérulos e a progressão da doença renal.

A restrição proteica gestacional pode reduzir o número de glomérulos e aumentar o volume glomerular, sendo que estas alterações hemodinâmicas estão associadas à hiperfiltração, por um período prolongado, que pode promover microalbuminúria e acelerar o processo de perda da função renal (MESQUITA et al., 2010). O quadro de obesidade também é associado a graves alterações na estrutura e função dos rins, incluindo proteinúria. Alguns mecanismos que alteram a hemodinâmica glomerular estão sendo relacionados ao aparecimento de microalbuminúria. Algumas alternativas terapêuticas para reduzir a proteinúria consistem em fármacos que bloqueiam o sistema SRAA, como por exemplo, os antagonistas de renina, os bloqueadores dos receptores de angiotensina II (BRA) e inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA). Isso se deve ao fato desses fármacos aumentarem os níveis plasmáticos de moléculas que possuem propriedades anti-fibróticas. Fármacos que reduzem os níveis de lipídios circulantes, como a classe das estatinas também tem demonstrado discreta redução dos níveis de proteinúria (PRAGA, 2005).

7- CONCLUSÃO

O consumo de dieta hiperlipídica durante seis semanas de vida provocou, em ratos submetidos ou não à restrição protéica gestacional:

- aumento do índice de adiposidade;
- aumento na concentração sérica de colesterol;
- aumento da pressão arterial;
- redução da natriurese por diminuição de excreção tubular proximal;
- aumento na expressão tubular apical de AT1r;
- aumento de marcadores de fibrose;
- alterações na estrutura glomerular e proteinúria.

Estas alterações foram mais acentuadas nos grupo LPH o que nos permite concluir que a sobrecarga calórica em animais programados por restrição protéica gestacional é extremamente deletéria para a morfologia e função renal.

8 – REFERÊNCIAS

Acree LS, Comp PC, Whitsett TL, Montgomery PS, Nickel KJ, Fjeldstad AS, Fjeldstad C, Gardner AW. The influence of obesity on calf blood flow and vascular reactivity in older adults. Dyn Med 2007; 6: 4-11.

Alaniz MHF, Takada J, Vale MICA, Lima FB. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. Arq Bras Endocrinol Metab 2006; 50(2): 216-229.

Angelbeck JH, DuBrul EF. The effect of neonatal testosterone on specific male and female patterns of phosphorylated cytosolic proteins in the rat preoptic-hypothalamus, cortex and amygdala. Brain Res 1983; 264: 277–283.

Armitage JA, Khan IY, Taylor PD, Nathaniel PW, Poston L. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? J Physiol 2004; 561: 355-377.

Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Sindrome Metabólica. Atualização das diretrizes para o tratamento farmacológico da obesidade e do sobrepeso. ABESO 2010; 76: 1-18.

Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Sindrome Metabólica. Aspectos epidemiológicos da obesidade infantil. ABESO 2011; 49.

Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. Am J Cardiol 1998; 81: 7-12.

Bagley DM, Hayes JR. Neonatal phenobarbital administration results in increased cytochrome P450-dependent monoocygencase activity in adult male and female rats. Biochem Biophys Res Commun 1983; 114: 1132–1137.

Baptista I. Educação alimentar em meio escolar - Referencial para uma oferta alimentar saudável. Direção Geral de Inovação e Desenvolvimento Curricular 2006; 1: 7-33.

Barker DJP, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. Lancet 1989; 577-580.

Barker DJP, Hales CN, Fall CHD, Osmond C, Phipps K, Clark PMS. Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. Diabetologia 1993; 7: 36-62.

Barker DJP. Intrauterine programming of adult disease. Mol Med Today 1995; 1(9): 418-423.

Barker DJP. Fetal origins of coronary heart disease. Br Med J 1995; 311: 171–4.

Barker DJP. In utero programming of chronic disease. Clinical Science 1998; 95: 115-128.

Barker DJP. The developmental origins of chronic adult disease. Acta Paediatrica 2004; 93: 26-33.

Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. Eur Cytokine Netw 2006; 17(1): 4-12.

Baynes, JW, Dominiczak, MH. Bioquímica Médica. 2ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2007.

Bellaver L, Vital MA, Arruda AM. Efeitos da dietilpropiona, energia da dieta e sexo sobre o ganho de peso corporal, peso dos órgãos e deposição de tecidos em ratos. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia 2001; 45(2): 167-172.

Benediktsson R, Lindsay RS, Noble J, Seckl JR, Edwards CR. Glucocorticoid exposure in utero: new model for adult hypertension. Lancet 1993; 341: 339-341.

Bismarck-Nasr EM, Frutuoso MFP,Gamabardella AMD. Efeitos tardios do baixo peso ao nascer. Rev Bras Crescimento Desenvol Hum 2008; 18(1): 98-103.

Bobulescu IA, Dubree M, Zhang J, McLeroy P, Moe OW. Effect of renal lipid accumulation on proximal tubule Na +/ H+ exchange and ammonium secretion. Am J Physiol Renal Physiol. 2008; 294: 1315-1322.

Bobulescu IA. Renal lipid metabolism and lipotoxicity. Curr Opin Nephrol Hypertens 2010; 19(4): 393-402.

Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? Am J Hypertens 1988; 1: 335-347.

Cabalgante MJ, Gadola L, Luzardo L, Márquez M, Boggia J, Boim MA. Calcium citrate improves the epithelial-to-mesenchymal transition induced by acidosis in proximal tubular cells. J Bras Nefrol 2012; 34(4): 343-8.

Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. Physiol Rev 2004; 84: 277-359.

Carvajal G, Rodriguez-Vita J, Rodrigues-Diez R, Sanchez Lopez E, Ruperez M, Cartier C, Esteban V, Ortiz A, Egido J, Mezzano SA, Ruiz-Ortega M. Angiotensin II activates the Smad pathway during epithelial mesenchymal transdifferentiation. Kidney Int 2008; 74: 585-595.

Carvalheira JB, Torsoni MA, Ueno M, Amaral ME, Araujo EP, Velloso LA, Gontijo JA, Saad MJ. Cross-talk between the insulin and leptin sig-naling systems in rat hypothalamus. Obes Res. 2005; 13: 48-57.

Cat AND, Touyz RM. Cell signaling of angiotensin II on vascular tone: Novel Mechanism. Current Hypertension Reports 2011: 13(2); 122-128.

Chen D, Chen Z, Park C, Centrella M, McCarthy T, Chen L, Al-Omari A, Moeckel GW. Aldosterone stimulates fibronectin synthesis in renal fibroblasts through mineralocorticoid receptor-dependent and independent mechanisms. Gene 2013; 531(1): 23-30.

Cinti S, Mitchell G, Barbatelli G. Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. J Lipid Res 2005; 46(11): 2347-2355.

Cindik N, Baskin E, Agras PI, Kinik ST, Turan M, Saatci U. Effect of obesity on inflammatory markers and renal functions. Acta Pediatr 2005; 94: 1732-7.

Cullen-McEwen LA, Kett MM, Dowling J, Anderson WP, Bertram JF. Nephron number, renal function, and arterial pressure in aged GDNF heterozygous mice. Hypertension 2003; 41: 335-340.

Daniels D, Yee DK, Fluharty SJ. Angiotensin II receptor signalling. Exp Physiol 2007; 92: 523-7.

Desai M, Babu J, Ross MG. Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2007; 293: 2306-2314.

Dodic M, Hantzis V, Duncan J, Rees S, Koukoulas I, Johnson K, Wintour E, Moritz K. Programming effects of short prenatal exposure to cortisol. FASEB J 2002; 16: 1017-1026.

Eddy AA, Neilson EG. Chronic kidney disease progression. J Am Soc Nephrol 2006; 17: 2964-6.

El-Sabban, Hassan KA, Birbari AE, Bitar KM, Bikhazi AB. Angiotensin II binding and extracellular matrix remodelling in a rat model of myocardial infarction. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst 2000; 1(4): 369-378.

Forsdahl A. Observations throwing light on the high mortality in the county of Finnmark. Is the high mortality today a late effect of very poor living conditions in childhood and adolescence? Int J Epidemiol 2002; 31: 302-8.

Fowden AL, Giussani DA, Forhead AJ. Intrauterine programming of physiological systems: Causes and consequences. Physiology (Bethesda) 2006; 21: 29-37.

Gaíva MHG, Couto RC, Oyama LM. Polyunsaturated fatty acid rich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats. Br J Nutr 2001; 86: 371-377.

Garcia WE, Gontijo JAR, Figueiredo JF. “Clearance” de lítio como método de avaliação do manuseio tubular de sódio em ratos acordados, estudados em gaiolas metabólicas. Jornal Bras Nefrol 1991; 13(3); 89-94.

Godfrey KM, Barker DJ, Robinson S, Osmond C. Maternal birth weight and diet in pregnancy in relation to the infant's thinness at birth. Br J Obstet Gynaecol 1997; 104(6): 663-637.

Godin CM, Ferguson SSG. Biased agonism of the angiotensin II type1 receptor. Medicinal Chemistry 2012; 12: 812-816.

Gordon KJ, Blobe GC. Role of transforming growth factor-β superfamily signaling pathways in human disease. Biochimica et Biophysica Acta 2008; 1782: 197–228.

Guedes AM, Cabrita A, Pinho AT, Silva AP, Lopes A, Santos V, Neves PL. O Risco Renal da Obesidade. Acta Med Port 2010; 23: 853-8.

Guyton AC, Hall JE. Tratado De Fisiologia Médica. 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997.

Guyton AC, Hall JE. Tratado De Fisiologia Médica. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

Harris RC, Neilson EG. Toward a unified theory of renal progression. Annu Rev Med 2006; 57: 365-380.

Higuchi S, Ohtsu H, Suzuki H, Shirai H, Frank GD, Eguchi S. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: Novel insights into mechanisms and pathophysiology. Clin Sci (Lond) 2007; 112: 417-428.

Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickhers MH. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. J Physiol 2009; 587: 905-915.

Hsueh WA, Quinones MJ. Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. Am. J. Cardiol 2003; 300(92): 10-7.

Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. J Clin Invest 2002; 110: 341-350.

Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. Cell 1992; 71: 169-180.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. 10ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

Kagami S, Border WA, Miller DE, Noble NA. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. J Clin Invest 1994; 93: 2431-7.

Kambham N, Markowitz GS, Valeri AM, Lin J, Agati VD. Obesity-related glomerulopathy: An emerging epidemic. Kidney International 2001; 59: 1498-1509.

Keys A, Menotti A, Aravanis C, Blackburn H, Djordjevic BS, Buzina R, Dontas AS, Fidanza F, KarvonenMJ, Kimura N, Mohacek I, Nedeljkovic S, Puddu V, Punsar S, Taylor HL, Conti S, Kromhout D, Toshima H. The Seven Countries Study: 2,289 deaths in 15 years. Prev Med 1984; 13: 141-154.

Kimura K, Iwano M. Molecular mechanisms of tissue fibrosis. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi 2009; 32: 160-7.

Klahr S, Ishidoya S, Morrissey J. Role of angiotensin II in the tubulointerstitial fibrosis of obstructive nephropathy. Am J Kidney Dis 1995; 26: 141-6.

Knight SF, Quigley JE, Yuan J, Roy SS, Elmarakby A, Imig JD. Endothelial dysfunction and the development of renal injury in spontaneously hypertensive rats fed a high-fat diet. Hypertension 2008; 51: 352-9.

Kotsis V, Stabouli S, Papakatsika S, Rizos Z, Parati G. Mechanisms of obesity-induced hypertension. Hypertension Research 2010; 33: 386-393.

Lan HY, Mu W, Tomita N, Huang XR, Li JH, Zhu HJ, Morishita R, Johnson RJ. Inhibition of renal fibrosis by gene transfer of inducible Smad7 using ultrasound-microbubble system in rat UUO model. J Am Soc Nephrol 2003; 14: 1535-1548.

Langley-Evans SC, Jackson AA. Captopril normalizes systolic blood pressure in rats with hypertension induced by fetal exposure to maternal low protein diet. Comp Biochem Physiol A Physiol 1995; 110: 223-8.

Langley-Evans SC, Welham SJ, Sherman RC, Jackson AA. Weanling rats exposed to maternal low-protein diets during discrete periods of gestation exhibit differing severity of hypertension. Clin Sci 1996; 91: 607-615.

Langley-Evans SC. Maternal carbenoxolone treatment lowers birthweight and induces hypertension in the offspring of rats fed a protein-replete diet. Clin Sci (Lond) 1997; 93(5): 423-9.

Langley-Evans SC. Nutrition programming of disease: unraveling the mechanism. J Anat 2009; 215: 36-51.

Langley-Evans SC, McMullen S. Developmental origins of adult disease. Med Princ Pract 2010; 19: 87-98.

Lasaitiene D, Chen Y, Adams M, Friberg P. Further insights into the role of angiotensin II in kidney development. Clin Physiol Funct Imaging 2006; 26: 197-204.

Lauterio TJ, Barkan A, Deaangelo M, Demott-Friberg R, Ramirez R. Plasma growth hormone secretion is impaired in obesity-prone rats before onset of diet induced obesity. Am J Physiol 1998; 275(1): 6-11.

Lazinski MJ, Shea AK, Steiner M. Effects of maternal prenatal stress on offspring development: a commentary. Arch Womens Ment Health 2008; 11: 363-375.

Levin BE, Dunn-Meynell AA, MCMinn JE, Aaperovich M, Cunningham-Bussel A, Chua SC. A new obesity-prone, glucose-intolerant rat strain (F.DIO). Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2003; 285: 1184-1191.

Li Y, Kang YS, Dai C, Kiss LP, Wen X, Liu Y. Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria. Am J Pathol 2008; 172: 299-308.

Liu BC, Sun J, Chen Q, Ma KL, Ruan XZ, Phillips AO. Role of connective tissue growth factor in mediating hypertrophy of human proximal tubular cells induced by angiotensin II. Am J Nephrol 2003; 23: 429-437.

Lucas A. Programming by early nutrition in man. In: Bock, G.R. and Whelan, J. The Childhood Environmental and Adult Disease. John Wiley e Sons, Chichester, UK, pp. 38-55. 1991.

Luke B, Jhonson TR, Petrie RH. The historical basis of maternal nutrition recommendations. In: Chemical maternal fetal nutrition. Boston: Little Brow 1993; 5-28.

Lutaif NA, Rocha EM, Veloso LA, Bento LM, Gotijo JAR. Renal contribuition to thermolability in rats: role of renal nerves. Nephrol Dial Transplan. 2008; 12: 3798-3805.

Marchand MC, Langley-Evans SC. Intrauterine programming of nephron number: the fetal flaw revisited. Journal of Nephrology 2001; 14: 327-331.

Martin-Gronert MS, Ozanne SE. Maternal nutrition during pregnancy and health of the offspring. Biochem Soc Trans 2006; 34: 779-782.

McMillen IC, Robinson JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. Physiol Rev 2005; 85: 571-633.

Mesquita FF, Gontijo JA, Boer PA. Maternal undernutrition and the offspring kidney: from fetal to adult life. Braz J Med Biol Res 2010; 43(11): 1010-1018.

Mesquita FF, Gontijo JA, Boer PA. Expression of renin-angiotensin system signalling compounds in maternal protein-restricted rats effect on renal sodium excretion and blood pressure. Nephrol Dial Transplant 2010; 25(2): 380-8.

Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II and renal fibrosis. Hypertension 2001; 38: 635-8.

Moon JH, Lee Ji Y, Kang SB, Park JS, Lee BW, Kang ES, Ahn CW, Lee HC, Cha BS. Dietary Monounsaturated Fatty Acids but not Saturated Fatty Acids Preserve the Insulin Signaling Pathway via IRS-1/PI3K in Rat Skeletal Muscle. Lipids 2010; 45: 1109-1116.

Moorhead JF, Chan MK, El-Nahas M, Varghese Z. Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubule-interstitial disease. Lancet 1982; 8311: 1309-1311.

Monteiro CA. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil. Estudos avançados 2003; 48: 7-20.

Montell E. Dag accumulation from saturated fatty acids desensitizes insulin stimulation of glucose uptake in muscle cells. Am J Physiol Endocrinol Metab 2001; 280(2): 229-237.

Moreira R. Alimentação do adolescente. Endocrinologia Metabolismo e Nutrição 1993; 2(6): 409-416.

Nakamura T, Kawagoe Y, Ogawa H, Ueda Y, Hara M, Shimada N, Ebihara I, Koide H. Effect of low-density lipoprotein apheresis on urinary protein and podocyte excretion in patients with nephrotic syndrome due to diabetic nephropathy. Am J Kidney Dis 2005; 45(1): 48-53.

Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima LAP, Nogueira CR, Novelli EL. Misclassification probability as obese or lean in hypercaloric and normocaloric diet. Biol Res 2008; 41(3): 253-259.

Nelson DL, Cox MM. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5ed. Porto Alegre:Artmed; 2011.

Nielsen S, Halliwill JR, Joyner MJ. Vascular response to angiotensin II in upper body obesity. Hypertens 2004; 44: 435-441.

Odgen CL, Carroll MD, Kit BK, Flegel KM. Prevalence of obesity and trends in body mass index among US chlindren and adolescents, 1999-2010. JAMA 2012; 307(5): 483-490.

Pak CY, Sakhaee K, Peterson RD, Poindexter JR, Frawley WH. Biochemical profile of idiopathic uric acid nephrolithiasis. Kidney Int. 2001; 60(2): 757-761.

Parker DR. Relationship of dietary saturated fatty acids and body habitus to serum insulin concentrations: the Normative Aging Study. Am J Clin Nutr 1993; 58(2): 129-136.

Paula RB, Fernandes N, Carmo VMP, Andrade LCF, Bastos MG. Obesidade e Doença Renal Crônica. J Bras Nefrol 2006; 28(3): 158-164.

Perico N, Benign IA, Remuzzi G. Present and future drug treatments for chronic kidney diseases: Evolving targets in renoprotection. Nat Rev Drug Discov 2008; 7: 936-953.

Petermann A, Floege J. Podocyte damage resulting in podocyturia: a potential diagnostic marker to assess glomerular disease activity. Nephron Clin Pract 2007; 106: 61-6.

Pinhal CS, Lopes A, Torres DB, Felisbino SL, Rocha Gontijo JA, Boer PA. Time-course morphological and functional disorders of the kidney induced by long-term high-fat diet intake in female rats. Nephrol Dial Transplant 2013; 28(10): 2464-76.

Praga M. Therapeutic measures in proteinuric nephropathy. Kidney Int Suppl 2005; 99: 137-141.

Rahmouni K, Correia ML, Haynes WG, Mark AL. Obesity associated hypertension: new insights into mechanisms. Hypertension 2005; 45: 9-14.

Rosenbloom J, Castro SV, Jimenez SA. Fibrotic diseases: Cellular and molecular mechanisms and novel therapies. Ann Intern Med 2010; 152: 159–166.

Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II modulates cell growth-related events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. Kidney International 1997; 52: 1497–1510.

Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, Ruperez M, Egido J. Proinflammatory actions of angiotensins. Curr Opin Nephrol Hypertens 2001; 10: 321–9.

Ruster C, Wolf G: Renin-angiotensin-aldosterone system and progression of renal disease. J Am Soc Nephrol 2006; 17: 2985–2991.

Ruster C, Bondeva T, Franke S, Tanaka N, Yamamoto H, Wolf G. Angiotensin II upregulates rage expression on podocytes: Role of AT2 receptors. Am J Nephrol 2009; 29: 538–550.

Ruster C, Wolf G. Angiotensin II as a morphogenic cytokine stimulating renal fibrogenesis. J Am Soc Nephrol 2011; 22(7): 1189-1199.

Sakai N, Wada T, Matsushima K, Bucala R, Iwai M, Horiuchi M, Kane KOS. The renin-angiotensin system contributes to renal fibrosis through regulation of fibrocytes. J Hypertens 2008; 26: 780–790.

Sakhaee K. Recent advances in the pathophysiology of nephrolithiasis. Kidney International 2009; 75: 585-595.

Sanchez-Lopez E, Rodrigues DR, Rodriguez VJ, Rayego MS, Rodrigues DRR, Rodriguez GE, Lavoz BC, Mezzano S, Egido J, Ortiz A, Ruiz-Ortega M, Selgas R. Connective tissue growth factor (CTGF): A key factor in the onset and progression of kidney damage. Nefrologia 2009; 29: 382–391.

Santos RD, Gagliardi ACM, Xavier HT, Magnoni CD, Cassani R, Lottenberg AM. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. Arq Bras Cardiol 2013; 100: 1-40.

Schnyder B, Pittet M, Durand J, Schnyder-Candrian, S. Rapid effects of glucose on the insulin signaling of endothelial NO generation and epithelial Na transport. Am J Physiol Endocrinol Metab 2001; 282: 87-94.

Seckl JR. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. Eur J Endocrinol 2004; 151: 49-62.

Sene LB, Mesquita FF, Moraes LN, Santos DC, Carvalho R, Gontijo JAR, Boer PA. Involvement of Renal Corpuscle microRNA Expression on Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Maternal Low Protein Diet in Adult Programmed Rats. Plos One 2013; 8(8): 1-12.

Sharma K, Ziyadeh FN. The emerging role of transforming growth factor-beta in kidney diseases. Am J Physiol 1994; 266: 829–842.

Silva VC, Almeida SS. Desnutrição proteica no início da vida prejudica memória social em ratos adultos. Rev Nutr 2006; 19(2): 195-201.

Snoek A, Remacle C, Reusens B, Hoet JJ. Effect of a low protein diet during pregnancy on the fetal rat endocrine pancreas. Biol Neonate 1990; 57: 107–118.

Stewart PM, Whorwood CB, Mason JI. Type 2 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in fetal and adult life. J Steroid Biochem Mol Biol 1995; 55(6): 465-471.

Sun S, Ji Y, Kersten S, Qi L. Mechanisms of inflammatory responses in obese adipose tissue. Annu Rev Nutr 2012; 32: 261–286.

Thomsen K. Lithium clearance: A new method for determining proximal and distal tubular reabsorption of sodium and water. Nephron 1984; 37: 217-223.

Thomsen K, Shirley DG. The validity of lithium clearance as an index of sodium and water delivery from the proximal tubules. Nephron 1997: 77: 125-138.

Thomson AM, Billewicz WZ. Clinical significance of weight trends during pregnancy. Br Med J 1957; 1: 243-7.

Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. Br J Nutr 2004; 92: 347-355.

Trayhurn P, Wood IS. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. Biochem Soc Trans 2005; 33: 1078-1081.

Thibault L, Woods SC,Westerterp-Plantenga MS. The utility of models of human energy homeostasis. Br J Nutr 2004; 92: 41-50.

Vaccari B, Mesquita FF, Gontijo JA, Boer PA. Fetal kidney programming by severe food restriction: Effects on structure, hormonal receptor expression and urinary sodium excretion in rats. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst 2013.

Van-Herpen NA, Schrauwen-Hinderling VB. Lipid accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. Physiology & Behavior 2008; 94(2): 231-241.

Vickers, MH, Breier BH, McCarthy D, Gluckman PD. Sedentary behavior during postnatal life is determined by the prenatal environment and exacerbated by postnatal hypercaloric nutrition. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2003; 285(1): 271-3.

Wang T, Giebisch G. Effects of angiotensin II on electrolyte transport in the early and late distal tubule in rat kidney. Am J of Physiol Society 1996; 271: 143-9.

Welham SJ, Wade A, Woolf A. Protein restriction in pregnancy is associated with increased apoptosis of mesenchymal cells at the star of rat metanephrogenesis. Kidney International 2002; 61: 1231-1242.

Wenzel U. Aldosterone and progression of renal disease. Curr Opin Nephrol Hypertens 2008; 17: 44–50.

Wenzel UO, Krebs C, Benndorf R. The angiotensin II type 2 receptor in renal disease. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst 2010; 11: 37–41.

Wisse, BE. The Inflammatory Syndrome: The Role of Adipose Tissue Cytokines in Metabolic Disorders Linked to Obesity. J Am Soc Nephrol 2004; 15: 2792–2800.

Wolf G, Neilson EG. Angiotensin II induces cellular hypertrophy in cultured murine proximal tubular cells. Am J Physiol 1990; 259: 768–777.

Wolf G, Killen PD, Neilson EG. Intracellular signaling of transcription and secretion of type IV collagen after angiotensin II-induced cellular hypertrophy in cultured proximal tubular cells. Cell Regul 1991; 2: 219–227.

Wolf G, Haberstroh U, Neilson EG. Angiotensin II stimulates the proliferation and biosynthesis of type I collagen in cultured murine mesangial cells. Am J Pathol 1992; 140: 95–107.

Wolf G, Mueller E, Stahl RA, Ziyadeh FN. Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta. J Clin Invest 1993; 92: 1366–1372.

Wolf G, Ziyadeh FN, Zahner G, Stahl RA. Angiotensin II-stimulated expression of transforming growth factor beta in renal proximal tubular cells: Attenuation after stable transfection with the c-mas oncogene. Kidney International 1995; 48: 1818–1827.

Wolf G, Zahner G, Schroeder R, Stahl RA. Transforming growth factor beta mediates the angiotensin-II-induced stimulation of collagen type IV synthesis in cultured murine proximal tubular cells. Nephrol Dial Transplant 1996; 11: 263–9.

Wolf G, Ziyadeh FN, Stahl RA. Angiotensin II stimulates expression of transforming growth factor beta receptor type II in cultured mouse proximal tubular cells. J Mol Med 1999; 77: 556–564.

Wolf G. Angiotensin II as a mediator of tubulointerstitial injury. Nephrol Dial Transplant 2000; 15: 61–3.

Woods LL, Rasch R. Perinatal ANGII programs adult blood pressure, glomerular number, and renal functions in rats. Am J Physiol 1998; 275: 1593-9.

Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio DAA. Controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. J Nutr 2003; 133(4):1081-1087.

Zandi-Nejad K, Luyckx VA, Brenner BM. Adult hypertension and Kidney Disease: the role of fetal programming. Hypertension 2006; 77: 502-508.

Zats R. Bases fisiológicas da nefrologia. São Paulo: Editora Atheneu; 2011.

Zeisberg M, Neilson EG. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis. J Am Soc Nephrol 2010; 21: 1819–1834.

Zhang C, Knudson JD, Setty S. Coronary arteriolar vasoconstriction to angiotensin II is augmented in prediabetic metabolic syndrome via activation of AT1 receptors. Am J Physiol Heart Circ. Physiol 2005; 288: 2154-2162.

Zimanyi MA, Bertram JF, Black JM. Nephron number in the offspring of rats fed a low protein diet during pregnancy. Image Anal Stereol 2000; 19: 219-222.

Kidney effects of high fat diet intake in young adults male rats programmed on not by gestational protein restriction

Short title: Kidney effects of high fat diet intake in programmed rats

Victor Hugo Gonçalves Rizzi[1], José Antônio Rocha Gontijo[2] and Patrícia Aline Boer[1,2].

[1]Fetal Programming Laboratory, Morphology Department, São Paulo State University, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil
[2]Renal Function Laboratory, Campinas State University, UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brazil

Correspondence. Patricia Aline Boer, Ph.D., Morphology Department, Biosciences Institute, São Paulo State University, Botucatu, SP, Brazil. E-mail: boer@ibb.unesp.br

Conflict of interest: We affirm that there is no conflict of interest

Acknowledgments: Grants from CNPq, CAPES and FAPESP (2010/52696-0) supported this work

ABSTRACT

Background. Prior studies show that maternal protein-restricted offspring (LP) have pronounced reduction of nephron number and arterial hypertension associated with unchanged glomerular filtration rate and enhanced glomerular area that may be related with glomerular hyperfiltration/overflow and account for the glomerular filtration barrier breakdown and early glomerulosclerosis. Additionally, evidence is emerging that highlights the far-reaching consequences of high fat diet (HFD) on kidney morphology and function disorders. The present study aims to evaluate the effect of HFD on renal function and morphology in LP rats. **Methods.** Maternal protein-restricted offspring (LP, 6% casein) and normal protein intake rats (NP, 17% casein) were submitted to ingestion of HFD (LPH and NPH, respectively) or standard chow to rodents (LPN and NPN) from 8th to 13th of age. Renal Function, systemic arterial pressure, immunohistochemistry and scanning electron microscopy were performed and biochemical serum parameters analyzed. **Results.** The body adiposity and mass were reduced in LPN which in turn, increased in NPH and LPH groups. Striking increased in total cholesterol was observed in NPH and LPH, and increased LDL in LPH. The blood pressure was significant increase in LPH groups from the 10th and 12th week of life compared to the other groups. A reduced urinary excretion of sodium was observed in low-protein treated rats while NPH and LPH animals presented an increased urinary acidification in time-dependent fashion. The LPN, NPH and LPH groups showed an increased expression of AT1r, transforming growth factor (TGFβ-1), collagen and fibronectin. By ultraestructural analysis we found a pronounced enfacement of foot process in treated groups and HFD-treated offspring showed wear-out of podocytes by rupture of cell membranes. In parallel all treated rats present a significant urinary protein excretion. **Conclusion.** In conclusion, from our present knowledge, these are the first showing that HFD intake, enhance the susceptibility for adult renal disease with more gravity in fetal programed offspring causing tubular and glomeruli disorder that can induce renal failure.

Keywords: High fat diet, kidney fibrosis, renal function, fetal programming

INTRODUCTION

Nowadays both hypertension and obesity are important public health problem and may be related to nutritional gestational programming. The maternal protein restriction during pregnancy is associated with retardation of fetal growth and enhanced susceptibility to develop a number of adult diseases [1]. The low birth weight have been related to enhanced risk to develop hypertension, diabetes type 2, cardiovascular diseases, obesity and metabolic syndrome in adult life [2-4].

The kidney development is affected by programming resulting irreversible nephron deficit, that have been demonstrated in studies with different species including man [5-10]. Studies from our group have demonstrated that offspring from mothers submitted to gestational low protein diet, at 16-wk-age, presented pronounced reduction of nephron number associated with decreased fractional urinary sodium excretion and hypertension when compared with the control-diet age-matched group. These results occurred despite unchanged glomerular filtration rate and 17% enhanced glomerular tufts area, suggesting that prior tubular dysfunction with enhanced water and sodium reabsorption might, at last in part, be responsible by programming of adult hypertension [11]. However, these morphological and functional changes could be also, attributed to reduced nephron number associated with glomerular hyperfiltration/overflow that may account for the glomerular filtration barrier breakdown and early glomerulosclerosis [11,12] in low protein diet offspring.

More recently, using the same model described above, we suggested that glomerular miR200 family can be early upregulated by TGF-β1 action inducing type I collagen expression that may subsequently, cause glomeruli epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) by decreasing these miRNAs at later time points [13].

By the other side, in modern lifestyle the eating habits of the world population have included high fat and carbohydrate diets. These habits interact with genetic factors, which may explain the excessive body fat throughout the world [14,15]. An epidemiologycal study have demonstrated that in 2008, an estimated 1·46 billion adults (1·41—1·51 billion) worldwide had BMI of 25 kg/m2 or greater, of these 502 were obese [14].

The high fat diet (HFD) intake and the obesity are related to increased prevalence of cardiovascular disease, dyslipidemia, type 2 diabetes mellitus and chronic kidney disease [16,17]. The renal diseases related to HFD consumption are associated to

enhanced tubule reabsorption of sodium and increased blood pressure [18]. Moorhead et al. [19] proposed that dyslipidemia may contribute to the progression of renal disease. In a recent study Grubbs et al. [15] showed that higher body mass index (BMI) categories are associated with greater declines in kidney function in a cohort of young adults with preserved glomerular filtration rate (GFR) at baseline. However, the exact mechanism involved in kidney disorders provoked by HFD ingestion and obesity is not totally established.

Previous studies from our laboratory have showed kidney progressive dysfunctions, in female rats, after nine weeks of HFD intake. These dysfunctions occurred in parallel to glomeruli structural disorder whit podocytes injuries associated with enhanced glomerular expression of proteins intrinsically related to fibrotic process (TGFβ-1, collagen and fibronectin). Additionally, we observed proteinuria and renal sodium and water retention [20].

Has been demonstrated that angiotensin II (AngII) stimulates the proliferation of kidney fibroblasts in culture and increases expression of mRNA encoding TGFβ, fibronectin and collagen type I [21,22]. Subsequently the TGFβ may stimulate the accumulation of matrix and inflammation [23-25]. Other studies showed that AngII stimulate kidney proximal tubule cells to synthesize TGFβ-1 [26-28]. ANG II also induces adrenal synthesis of aldosterone that results in TGFβ-1 and fibronectin accumulation [29,30].

Considering that the glomeruli are the first nephron structures affected for pressure overload, we suppose that maternal protein restriction programmed rats, submitted to HFD intake in young age, can develop more accentuated and/or early hypertension resulting in more intensive overload in remaining nephrons that may be a preponderant factor for the development of fibrous process and altered glomerular ultrastructure.

Thus, in this study, we investigate the kidney expression of AngII receptor type 1 (AT1R) and fibrotic markers in parallel with kidney function in 14-week old male offspring programed or not by low protein diet that receive or not HFD in young adult life (from 8ª to 13ª weeks of life), compared with age-matched controls. Additionally, protein urinary excretion rate was evaluated and scanning electron microscopy were used to characterize the glomerular function and structure.

MATERIALS AND METHODS

Animals and diets – The experiments were approved by the ethical committee for experimental research at Institute of Biosciences (408-CEUA) at São Paulo State University. The general guidelines established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) were followed throughout the investigation.

The assays were conducted on age-matched, male offspring of sibling-mated Wistar Hannover rats (0.250–0.300 kg) with free access to water and standard rodent diet (Nuvital, Curitiba, PR, Brazil). Our local colonies originated from a breeding stock supplied by CEMIB/Unicamp, Campinas, SP, Brazil. Immediately after weaning at 3 weeks of age, animals were maintained under controlled temperature (25ºC) and lighting conditions (07:00 h-19:00 h), with free access to tap water and standard rodent laboratory diet, and followed up to 14 weeks of age. The day that sperm were seen in the vaginal smear was designated as day 1 of pregnancy. Forty dams were maintained on isocaloric standard rodent laboratory diet with normal protein content [NP, n = 20], (17% protein) or low protein content [LP, n = 20] (6% protein) diet ad libitum intake throughout the entire pregnancy. The male pups were followed and maintained with normal diet until 8 weeks old. Of until 8^{th} to 13^{th} week animals of the NP group were fed with standard diet (NPN group, n = 10, diet with 2.93 cal/g) or high fat diet (NPH group, n = 10, dietary 5.44 cal/g). The LP group animals were also divided receiving standard diet (LPN group, n = 10, diet 2.93 cal/g) or high fat diet (HFD) (LPH group, n = 10, 5.44 diet cal/g).

The rats were euthanized in the 14^{th} week of age and pelvic, gonadal and retroperitoneal adipose tissue was removed and weighted. The adiposity index was calculated by ratio of total adipose tissue weight to body weight. The kidneys were weighed and tissues samples were collected for histology and immunohistochemistry.

Blood Pressure Measurement - The systemic arterial pressure of the animals was measured in 8^{th}, 10^{th} and 12^{th} weeks old (NPN n=8; NPH n=8; LPN n=8; LPH n=8), using the tail-cuff method coupled to an electrosphygmomanometer, combined with a pneumatic pulse transducer/amplifier. The mean of three consecutive readings represented the systolic blood pressure.

Measurement of urinary pH - Urine pH was determined weekly from the 8^{th} to the 14^{th} week old. The rats were placed in metabolic cages, leaving solid fasting for a period

of 8 hours. After last time, was determined urinary pH using a pHmeter (Qx1500 - Qualxtron).

Renal Function Evaluation - The renal function tests were performed and estimated by creatinine and lithium clearance in unanesthetized, unrestrained rats at 14 weeks of age. Briefly, fourteen hours before the renal test, 60µmol LiCl 100g -1 body weight was given by gavage. After an overnight fast, each animal received a load of tap water by gavage (5% of the body weight); followed by a second load of the same volume, 1 hour later and, spontaneously voided urine was collected over 120-min period into a graduated centrifuge tube. At the end of the experiment, blood samples were drawn through the cardiac puncture in anesthetized rats and urine and plasma samples were collected for analysis. Creatinine clearance was used to estimate glomerular filtration rate (GFR) and lithium clearance (CLi) was used to assess proximal tubule output [11]. Fractional sodium excretion ($FENa^+$) was calculated as CNa^+/CCr x 100, where CNa^+ is sodium clearance and CCr is creatinine clearance. The fractional proximal ($FEPNa^+$) and post-proximal ($FEPPNa^+$) sodium excretion was calculated as CLi/CCr x 100 and CNa/CLi x 100, respectively.

Lipid profile - The serum cholesterol (BIOCLINK-083), triglycerides (BIOCLINK-117) and HDL cholesterol (BIOCLINK-015) were determined by enzyme-colorimetric method. The samples were analyzed in automatic equipment (Cobas Mira-Roche®) for an absorbance at 500nm, while as serum levels of LDL cholesterol (BIOCLINK-088) were analyzed to an absorbance of 600nm. According to the absorbance values were applied to the calculations by following the instructions at diagnosis kit supplier.

Measurement of proteinuria– In the 14^{th} week of age male rats from all groups (NPN n=5; NPH n=5; LPN n=5; LPH n=5) received a load of tap water by gavage (5% of the body weight) and twenty minutes after were housed individually in metabolic cages, and spontaneously voided urine was collected over a 2h period and immediately stored at -20°C until processing. The proteinuria was detected using the BIOPROT U/LCR (*Bioclin*).

Histology and Immunohistochemistry - Kidneys were removed and placed in the fixative (paraformaldehyde 4% in 0.1M phosphate buffer pH 7.4) for 15-h, followed 70% alcohol until be processed for paraffin inclusion. The paraffin blocks were cut into

5-µm-thick sections. Picrosirius technic was used to evaluate the density of collagen. Ten cortical field so fetch histological section (n=5 for each group) were analyzed and the average of the readings determined the density of collagen. Images were captured with photo microscope and analyzed by the Leica Qwin 3.1 for windows. For immunohistochemistry paraffin sections were incubated, overnight at 4°C, with primary antibodies for TGFß-1, AT1R (Santa Cruz Biotechnology) and fibronectin (Abcam). Secondary antibodies were used according to the primary antibody. Finally, sections were revealed with DAB, counterstained with Mayer's hematoxylin, dehydrated, and mounted. No immunoreactivity was seen in control experiments in which the primary antibodies were omitted.

Scanning Electron Microscopy - In the 14^{th} week of age male rats from the all groups (NPN n=3; NPH n=3; LPN n=3; LPH n=3) were used. The rats were anesthetized with a mixture of ketamine (75 mg.kg-1body weight, i.p.) and xylazine (10 mg.kg-1body weight, i.p.) and perfused by the left carotid artery with saline containing heparin (5%) for 15 minutes under constant pressure. This was followed by perfusion with 0.1 M phosphate buffer (PB; pH 7.4) containing 4% (w/v) paraformaldehyde and 0.1 M sucrose for 25 min. After perfusion, renal cortical slices were immersed in Karnovsky's solution (2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4) at 4ºC overnight. After rinsing in phosphate buffer for 1 hour, the specimens were post fixed in buffered 1% OsO4 at 4ºC in the dark for 2 hours and immersed in a 2.3 M sucrose solution, bat 4ºC overnight. The specimens were subsequently immersed for 30 min in liquid nitrogen and then fractured, washed in the same buffer, dehydrated in a graded acetone series, and critical-point dried (Leica CPD030). After identifying the fractured surface, specimens were mountedon stubs, sputtered (SCD050, Bal-Tec), with gold for 120s, and examined and photographed with a scanning electronmicroscope (Quanta 200 – FeiCompany) operated at 10 kV.

Statistical analysis - Data obtained from this study are expressed as the mean ± SD. Statistical analyses were performed using Newman Keuls or Bonferroni, ANOVA one-way from GraphPadPrism 5.01 (GraphPad Software, Inc., USA). The level of significance was set at P≤0.05.

Results

Adiposity Index and lipid profile -The body adiposity was reduced in LPN and increased in the groups that received HFD (NPH and LPH) (Figure 1). Animals of the LPH group had lower levels of HDL cholesterol compared to the control group (NPN) and the LDL cholesterol LPH group showed higher levels compared to the NPN group. The total cholesterol and triglyceride levels were higher in the groups (NPH and LPH when compared to animals receiving normal diet (Table 1).

Urinary pH -The current study shows that from the 1^{th} to 14^{th} week of high fat diet, there was a significant reduction in the urinary pH in the groups that were submitted to HFD (Figure 2). We found greater reduction in urine pH in animals from LPH group when compared to that observed in NPH. From the 11^{th} week the urinary pH from LPN group was significantly enhanced when compared to that found in NPN group (Figure 2).

Blood pressure – From the 10^{th} week of life we observed significant increase in the systolic pressure of rats from LPN group comparatively to that found in NPN group. The LPH group presented higher systolic pressure than NPH and NPN in this week of life. In the 12^{th} week we the LPN group presented the same arterial pressure observed in the 10^{th} week while in the LPH group the pressure was significantly enhanced, being significantly higher from that found in in NPN and NPH groups (Figure 3).

Renal function data – The data for renal function in the 14^{th} week old rats are summarized in Figure 4. The glomerular filtration rate, estimated by CCr did not significantly differ among the groups. The current study showed an accentuated decrease of sodium clearance (CNa^+) and fractional urinary sodium excretion ($FENa^+$) in all experimental groups (NPH, LPN and LPH) when compared to control group (NPN). The decreased $FENa^+$ in HFD intake rats (NPH and LPH) was accompanied by a significant decrease in proximal sodium excretion ($FEPNa^+$). The post-proximal sodium excretion ($FEPPNa^+$) and potassium excretion did not significantly differ among the groups.

Histology and Immunohistochemistry

The immunohistochemical analysis of renal cortex showed higher apical tubular and glomerular expression of AT1R in NPH, LPN and LP groups comparatively with

that observed in NPN group (Figure 5A-D). In medullar portion we found reduction in AT1R immunoreactivity in NPH and LPH groups (Figure 5E-H).

The glomerular fibronectin content was also enhanced in NPH, LPN and more prominent in LPH (Figure 6A-D). Considering all cortical stroma we found raised expression of fibronectin in peritubullar spaces in all experimental groups when compared with control (Figure 6E-H). These enhance was more evident in LPH group. The same was observed in medullar portion (Figure 6I-L).

The cortical TGFβ1 expression was enhanced in animals submitted to HFD (Figure7A-D) and in the medulla enhanced expression was found in NPH and LPN groups (7E-H).

In the figure 8 (A and B) we have an example of the results obtained with picrosirius technique. By quantification we found that renal cortical stroma of experimental groups presented significant ($p<0.0001$) enhanced collagen content when compared with that observed in NPN group (Figure 8C).

Glomeruli ultrastructure – The normal glomerular visceral epithelium ultrastructure from NPN can be see, by SEM, in Figure 9 (A and B). In NPH group we have an overview which is evident flattening of podocytes (Figure 9C and D). We also observed the loss of integrity of the glomerular filtration slits for the loss of adhesion of the pedicels and accumulations of proteinaceous and vesicular materials (Figure 9E and F).

We found a pronounced enfacement of foot process in LPN group and wear-out of podocytes by rupture of cell membranes (Figure 10A and B). In animals of the LPH group, the changes were much more severe compared to those observed in previous groups. We found areas of "bare" in GBM indicating loss of podocytes (Figure 10C and D). Most podocytes showed large areas of flattening disruption of the plasma membrane (Figure 10E, F and G), which probably resulted in greater amounts of protein and vesicular clusters that we observed on the surface of the glomeruli. We also verified the disruption of glomerular capillaries with erythrocytes through the filtration membrane (Figure 10H).

Proteinuria – In NPH and LPN groups was observed a significant increased urinary protein excretion when compared to control group, but in the association of these two experimental conditions (LPH group) the levels of proteinuria were higher than all groups (Figure 11).

DISCUSSION

Evidence is emerging that highlights the far-reaching consequences of prenatal programming induced by nutritional stress on organ function and adult disease. In humans, low birth weight occurs more frequently in disadvantaged communities among whom there is often a disproportionately high incidence of adult cardiovascular disease, hypertension, diabetes mellitus, and kidney disorders [31]. Moreover, the consequences of high fat diet on kidney morphology and function disorders have been recently shown. Lin et al. [32] demonstrated that a diet rich in saturated fats is directly associated with the presence of albuminuria in middle-aged adults. Studies Brenner [33], Mesquita [12], proposed that congenital or programmed reduction in nephron number explains why some individuals are susceptible to hypertension and renal injury whereas others with sodium excess or diabetes seem relatively resistant under similar circumstances. A reduction in nephron number and therefore whole-kidney glomerular filtration area in maternal low-protein intake offspring, would result in reduced sodium excretory capacity, enhanced susceptibility to hypertension, and reduced renal reserve, thereby limiting compensation for renal injury and possibly explaining the higher prevalence of hypertension and renal disease observed in populations with high prevalence of low birth weight [34,35]. Here, we investigated the hypothesis that saturated fat intake in male offspring programmed by gestational low protein diet may be related to the accelerated hypertension and worst kidney dysfunction and if so, whether that is associated with AngII and TGFβ-1 pathways expression and consequently, with renal fibrosis. We may state that, at least in part, the kidney expression of fibrotic proteins are associated with adult later renal function disorder as a outcome suggesting that the kidney is an particular organ in which prolonged fat diet intake may be underlie to the early loss of organ function and occurrence of chronic kidney disease [20].

In the current study, LPH group showed an increased cholesterol and triglycerides plasma levels which was associated with significant enhance of adipose tissue deposition (adiposity index), when compared to age-matched control animals. This study also confirms the significant enhance in the arterial blood pressure in LPN group and, in this way, in this animals the hypertension was accentuated by HFD treatment.

Podocytes are highly terminally differentiated cells with major process and pedicels interlinked by ultrathin slit diaphragms. These cells are incapable of regenerative postnatal replication, therefore, the loss of podocytes may lead to areas of “bare” in GBM, which represent potential starting points for irreversible glomerular injury [36,37]. In both NPN and LPN offspring we have observed the effacement of podocytes and loss of normal structure of

filtration diaphragm [13]. Here, we found striking glomerular structural alterations in parallel to progressive proteinuria in offspring treated with HFD during 6-weeks (NPH and LPH), denoting a decreased efficiency on the glomerular filter barrier compared with age-matched rats that received normal diet. Furthermore, in the LPH group we find severe injuries in podocytes that certainly led to elevated proteinuria in this group. Podocyte injury underlies most forms of proteinuric kidney diseases [38] and is an essential feature of progressive glomerular diseases [39]. By the immunohistochemistry, the present study verified enhanced glomerular expression of AT1R, TGFβ-1, fibronectin and collagen, intrinsically related to fibrotic process.

The production of interstitial matrix compounds suggests that podocytes have adapted a mesenchymal phenotype after injury, which could profoundly change their functions [40]. TGFβ-1 triggers tubular EMT, and its expression are up-regulated in virtually every type of chronic kidney disease [38,39]. By the present data, we may state that glomerular transitional cells may be a predominant response of renal, particularly, of podocytes in most pathophysiological conditions.

Taken in account the above data, we may hypothesize that hypertension development and presumable overload in remaining nephrons [11,12,41], following maternal protein restriction accentuated by later HFD exposition may be a preponderant factor for the development of fibrous process and altered glomerular ultrastructure in rat offspring.

Further and interestingly, the immunohistochemical analysis in the present study demonstrated increase in the expression of AT1R and TGFβ-1 expression in the kidney cortex of NPH and much more in LPH offspring, compared to that observed in NPN group. Simultaneously, the study shows an increased expression of fibronectin and collagen deposition characterizing by accentuated collagen deposition evidenciated by picrosirius technic. The current study confirm the recent findings [13,20] indicating that glomerular cells, particularly the podocytes, undergo phenotypic conversion, characterized by accentuated loss of podocyte-specific structure and gain of transitional features particularly in HFD-treated offspring, suggesting a process reminiscent of EMT [40].

Studies have showed that AngII plays a key role in the progression of chronic kidney damage, contributing to renal fibrosis. Many *in vitro* and experimental studies have demonstrated that AngII activates renal cells to produce profibrotic factors and extracellular matrix proteins (ECM) [42,43]. The interrelation between AngII and TGFβ is well established. AngII and TGFβ share many, profibrotic mediators and intracellular signaling systems [44,45]. Therefore, in this study, an increased immunohistochemical renal

expression of AT1R could be driven-force that initiated profibrotic process by enhanced TGFβ-1 renal expression in HFD-treated compared to control rats. Here, as previously demonstrated in LP programmed studies, even with a decreased nephron number, growth-restricted rats have a whole kidney normal glomerular filtration rate (GFR) estimated by creatinine clearance, which suggested a compensatory glomerular hyperfiltration despite a loss of efficiency on the filter barrier [12,41]. We have been studying the model of low protein diet during pregnancy and our findings corroborate to the Brenner's hypothesis that hyperfiltration in low birth weight rats may lead to glomerular hypertension and in future, to renal disease [33]. The involvement of HFD treatment on renal functional test in gestational protein restricted offspring remains to be elucidated. In rats, the HFD causes renal injury that was preceded by endothelial dysfunction and hypertension, both induced by increasing oxidative stress, powerful inflammatory response and disruption of the renal filtration barrier [46]. The present investigation also demonstrated a pronounced decrease in fractional urinary sodium excretion in both HFD-treated offspring groups. The decreased FE_{Na+} was accompanied by a fall in FEP_{Na}^{+} and occurred despite unchanged C_{Cr} and, certainly on the sodium filtered load. Interesting the enhanced tubule sodium reabsorption was accompanied by elevation of urinary H^+ excretion (decreased urinary pH) permitting hypothesize the participation of proximal Na^+/H^+ exchanger in this mechanism. Although the precise mechanism by which renal sodium excretion decline in HFD-treated offspring remain to be elucidated, the loss of organ function, the sympathetic neural and renin-angiotensin activity and renal abnormal control of the fluid and electrolyte balance is thought to play a dominant role in the long-term sodium and water retention. Factors, such as leptin and oxidative stress, may contribute to sympathetic drive in high fat diet intake animals. Our results demonstrated, by immunostaining, an AT1R upregulated expression in HFD-treated rats; thus, increased renal angiotensin activity may induce ROS production by NAD(P)H oxidases.

In this way, we may suppose that compensatory maladaptive renal tubule functional changes may occur intrarenally when nephrogenesis is compromised. This is consistent with the fact that uninephrectomy in the adult rats does not necessarily cause hypertension, and no compensatory nephrogenesis can occur [44]. Speculatively, we may suppose that direct intrarenal actions of AngII contribute to increased tubular reabsorption, including constriction of glomerular arterioles, which alter peritubular capillary dynamics and renal medullary blood flow, and have direct actions on tubular epithelial cell transport. The exact mechanism by which AngII regulates the glomerular filtration coefficient remains to be

clarified. In fact, we cannot rule out that a possible indirect physical mechanism could underlie the decrease in renal sodium excretion. Speculatively, in the present study, hemodynamic glomerular changes, causing a decreased peritubular blood flow, may be responsible for enhanced sodium reabsorption in proximal segments of the nephron in diet programmed rats. The $FENa^+$ responses observed in the present study may result from the interactions of a variety of mechanisms, such as angiotensin-induced renal arteriolar postglomerular vasoconstriction, overexcitability of the sympathetic nervous system and by direct tubule effects in HFD-treated offspring and, consequently, associated with arterial hypertension.

In conclusion, from our present knowledge, these are the first data showing kidney progressive and accentuated dysfunction in maternal programmed animals, induced by 6-wk HFD treatment in young adult age, particularly, showing a striking structural disorder associated with enhanced glomerular expression of proteins intrinsically related to fibrotic process. This results led us to hypothesize that pronounced podocytes abnormalities would be prior induced glomerular hemodynamics alteration accompanied to activation of TGFβ-1 expression resulting rise in fibronectin and collagen expression. Additionally, we suggested that presumable podocyte injury in parallel with observed proteinuria be worse by HFD intake and is associated with striking loss of kidney function and to renal sodium and water retention and hypertension. In this way, we may state that HFD intake of programmed offspring, enhance the susceptibility for adult renal disease and, subsequently should cause renal failure at later time points in rats.

REFERENCES

1. Ashton N. Perinatal development and adult blood pressure. Braz J Biol Res 2000; 33: 731-740

2. Hales CN**,** Barker DJP. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Diabetologia 1992; 35: 595–601

3. Barker DJP, Hales CN, Fall CHD *et al*. Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. Diabetologia 1993; 7: 36-62

4. Barker DJP. In utero programming of chronic disease. Clinical Science 1998; 95: 115-128

5. Hinchliffe SA, Lynch MRJ, Sargent PH *et al*. The effect of intrauterine growth retardation on the development of renal nephrons. Br J Obstet Gynaecol 1992; 99: 296-301

6. Merlet-Benichou C, Gilbert T, Muffat-Joly M *et al*. Intrauterine growth retardation leads to a permanent nephron deficit in the rat. Pediatr Nephrol 1994; 8: 175-180

7. Langley-Evans SC, Welham SJM, Jackson AA. Fetal exposure to a maternal low protein diet impairs nephrogenesis and promoted hypertension in the rat. Life Sci 1999; 64: 965-974

8. Bassan H, Trejo LL, Kariv N *et al*. Experimental intrauterine growth retardation alters renal development. Pediatr Nephrol 2000;15:192-195

9. Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR *et al*. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertensio in rats. Pediatr Res 2001; 49: 460-467

10. Bauer R, Walter B, Ihring W *et al*. Altered renal function in growth-retricted newborn piglets. Pediatr Nephrol 2000; 14(8-9): 735-739

11. Mesquita FF, Gontijo JA, Boer PA. Expression of renin-angiotensin system signaling compounds in maternal protein-restricted rats: effect on renal sodium excretion and blood pressure. Nephrol Dial Transplant 2010; 25: 380–388

12. Mesquita FF, Gontijo JA, Boer PA. Maternal undernutrition and theoffspring kidney: from fetal to adult life. Braz J Med Biol Res 2010; 43: 1010–1018

13. Sene LB, Mesquita FF, Moraes LN *et al*. Involvement of Renal Corpuscle microRNA Expression on Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Maternal Low Protein Diet in Adult Programmed Rats. Plos One 2013; 8(8): 1-12

14. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ *et al*. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. Lancet 2011; 377: 557–567

15. Grubbs V, Lin F, Vittinghoff E *et al*. Body Mass Index and Early Kidney Function Decline in Young Adults: A Longitudinal Analysis of the CARDIA (Coronary Artery Risk Development in Young Adults) Study. Am J Kidney Dis 2013

16. Parker DR. Relationship of dietary saturated fatty acids and body habitus to serum insulin concentrations: the Normative Aging Study. Am J Clin Nutr 1993; 58: 129–136

17. Haslam DW, James WP. Obesity. Lancet 2005; 366: 1197-1209

18. Wang T, Giebisch G. Effects of angiotensin II on electrolyte transport in the early and late distal tubule in rat kidney. Am J Physiol Soc 1996; 271: 143–149

19. Moorhead JF, Chan MK, El-Nahas M *et al*. Lipid nephrotoxicity in chronic progressive glomerular and tubule-interstitial disease. Lancet 1982; 8311: 1309–1311

20. Pinhal CS, Lopes A, Torres DB *et al*. Time-course morphological and functional disorders of the kidney induced by long-term high-fat diet intake in female rats. Nephrol Dial Transplant 2013; 28(10): 2464-76

21. Romero-Calvo I, Ocón B, Martínez-Moya P *et al*. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. Anal Biochem 2010; 401: 318–320

22. Wolf G, Zahne G, Schroeder R *et al*. Transforming growth factor beta mediates the angiotensin-II-induced stimulation of collagen type IV synthesis in cultured murine proximal tubular cells. Nephrol Dial Transplant 1996; 11: 263–269

23. Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin II modulates cell growthrelated events and synthesis of matrix proteins in renal interstitial fibroblasts. Kidney Int 1997; 52: 1497–1510

24. Iwano M, Plieth D, Danoff TM *et al*. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. J Clin Invest 2002; 110: 341–350

25. Furlan FC, Marshall PS, Macedo RF *et al*. Acute intracerebroventricular insulin microinjection after nitric oxide synthase inhibition of renal sodium handling in rats. Life Sci 2003; 72: 2561–2569

26. Wolf G, Mueller E, Stahl RA *et al*. Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta. J Clin Invest 1993; 92: 1366–1372

27. Wolf G, Ziyadeh FN, Zahner G *et al*. Angiotensin II-stimulated expression of transforming growth factor beta in renal proximal tubular cells: Attenuation after stable transfection with the c-mas oncogene. Kidney Int 1995; 48: 1818–1827

28. Wolf G, Ziyadeh FN, Stahl RA. Angiotensin II stimulates expression of transforming growth factor beta receptor type II in cultured mouse proximal tubular cells. J Mol Med 1999; 77: 556–564

29. Gordon KJ, Blobe GC. Role of transforming growth factor-β superfamily signaling pathways in human disease. Biochimica et Biophysica Acta 2008; 1782: 197–228

30. Chen D, Chen Z, Park C *et al*. Aldosterone stimulates fibronectin synthesis in renal fibroblasts through mineralocorticoid receptor-dependent and independent mechanisms. Gene 2013; 531(1): 23-30

31. Luyckx VA, Brenner BM. Low birth weight, nephron number, and kidney disease. Kidney Int 2005; 97: 68-77

32. Lin J, Judd S, Le A *et al.* Associations of dietary fat with albuminuria and kidney dysfunction. Am J Clin Nutr 2010; 92(4): 897-904

33. Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure: Less of one, more the other? Am J Hypertens 1988; 1: 335–347

34. Lackland DT, Egan BM, Syddall HE *et al*. Associations between birth weight and antihypertensive medication in black and white medicaid recipients. Hypertension 2002; 39: 179–183

35. Hsu CY, Lin F, Vittinghoff *et al*. Racial differences in the progression from chronic renal insufficiency to end-stage renal disease in the United States. J Am Soc Nephrol 2003; 14: 2902–2907

36. Fan Q, Xing Y, Ding J *et al*. The relationship among nephrin, podocin, CD2AP, and alpha-actinin might not be a true 'interaction' in podocyte. Kidney Int 2006; 69: 1207-1215

37. Villar-Martini VC, Carvalho JJ, Neves MF *et al*. Hypertension and kidney alterations in rat offspring from low protein pregnancies. J Hypertens (Suppl) 2009; 27: 47-51

38. Mundel P, Kriz W. Structure and function of podocytes: an update. Anat Embryol 1995; 192: 385-397

39. Pippin JW, Brinkkoetter PT, Cormack-Aboud FC *et al*. Inducible rodent models of acquired podocyte diseases. Am J Physiol Renal Physiol 2009; 296: 213-229

40. Li Y, Kang YS, Dai C *et al*. Epithelial-to-mesenchymal transition is a potential pathway leading to podocyte dysfunction and proteinuria. Am J Pathol 2008; 172: 299-308

41. Kim TS, Kim JY, Hong HK *et al*. mRNA expression of glomerular basement membrane proteins and TGF-ß1 in human membranous nephropathy. J Pathol 1999; 189: 425–430

42. Vehaskari VM, Stewart T, Lafont D *et al*. Kidney angiotensin and angiotensin receptor expression in prenatally programmed hypertension. Am J Physiol Renal Physiol 2004; 287: 262–267

43. Alexander RW, Brock TA, Gimbrone MA *et al*. Angiotensin increases inositol trisphosphate and calcium in vascular smooth muscle. Hypertension 1985; 7: 447–451

44. Navar LG, Nishiyama A. Why are angiotensin concentrations so high in the kidney? Curr Opin Nephrol Hypertens 2004; 13: 107–115

45. Sharma M, Sharma R, Greene AS *et al*. Documentation of angiotensin II receptors in glomerular epithelial cells. Am J Physiol 1998; 274: 623–627

46. Lee HS. Mechanisms and consequences of TGF-overexpression bypodocytes in progressive podocyte disease. Cell Tissue Res 2012; 347: 129–140

LEGENDS OF FIGURES AND TABLES

Figure 1. Representation of adiposity index. Results are expressed as mean ± SD (N= 8, from 8 different mothers). *P<0.05; **P<0.001; ***P<0.0001.

Table 1. Lipid Profile

Figure 2. Representation of urinary pH. Results are expressed as mean ± SD (N=5, from 5 different mothers). *P<0.05; **P<0.001; ***P<0.0001.

Figure 3. Mean arterial pressure determined by tail cuff plethysmography. Results are expressed as mean ± SD (N=8, from 8 different mothers). *P<0.05; **P<0.001; ***P<0.0001.

Figure 4. Creatinine Clearance (CCr), sodium clearance (CNa), fractional sodium excretion (FENa), proximal (FEPNa) and post-proximal (FEPPNa) fractional sodium excretion and fractional potassium excretion (FEK) of rats whit 14 weeks of life. Results are expressed as mean ± SD (N=8, from 8 different mothers). * P<0.05, ** P<0.001, *** P<0.0001.

Figure 5. Renal AT1R immunostaining in the cortex (A-D) and medulla (E-H). In a control (A) we can observe the localization in vascular wall (arrow) and apical tubular membrane (*). In NPH group (B) AT1R expression was more intensive in glomeruli and apical portion of tubular cells. The enhance was more evident in LPN and LPH groups (C and D, respectively). The medullar AT1R expression was reduced in NPH (F) and LPH (H) when compared to NPN (A) and LPN (G).

Figure 6. Renal fibronectin cortical (A-H) and medullar (I-L) immunostaining. In control (A, E, I) we can observe a disperse glomerular and stromal content of fibronectin and NPH (B, F, J), LPN (C, G, K) and LPH (D, H, L) groups present raised fibronectin content that was more evident in the later.

Figure 7. Renal TGFβ-1 receptor immunostaining in the cortex (A –D) and medulla (E-H). In (A, E) we have NPN groups; in (B, F) we have NPH groups; in (C, G) we have LPN groups and in (D, H) we have LPH groups. Observe that the groups submitted to HFD presented enhaced expression.

Figure 8. Cortical renal collagen by Picrosirius technic. In A we have a representative cortical image from NPN group and in B the pattern found in LPH group. In C the graphic represent the cortical collagen quantification. Results are expressed as mean ± SD(N=5, from 5 different mothers). *** vs NPN (P<0.0001).

Figure 9. Photomicrographs of glomeruli from NPN (A and B) and NPH (C-F). In **A** we can observe normal ultrastructure of the glomerular capillaries covered by the visceral epithelium of Bowman's capsule. In **B** we have a detail that allows us to observe the primary extensions (PP), secondary (PS) and pedicels (p) of podocytes. Note the integrity of the filtration slits formed by the interdigitation of pedicels. In **C** we have an overview and in D a detail where is evident the flattening of podocytes. In **E** and **F** we can observe the loss of integrity of the glomerular filtration slits for the loss of adhesion of the pedicels (yellow arrows) and accumulation of proteinaceous and vesicular materials (yellow asterisks).

Figure 10. Photomicrographs of glomeruli from LPN (A and B) and LPH (C-H). In **A** we can observe flattening and simplification of podocytes. In region **B** we have demarcated by dotted square in **A** at higher magnification. Note the areas bounded by arrows where occurred disruption of the podocyte membrane. In **C** we have glomerular capillaries that loss podocytes (white arrows) and in **D** we have a detail of this region. In **E** we have a primary process (PP) with ruptured membrane showing cytoskeletal elements and accumulation of proteinaceous materials (yellow asterisks). We also found ruptured membrane (black arrows in **E** and **F**) and a podocyte without your plasmatic membrane (**G**) In **H** we can observe the image of aglomerular capillary showing ruptured capillary, erythrocytes (red arrows) and other constituents.

Figure 11. Graphic representing the urinary protein. Results are expressed as mean ± SD (N = 5, from 5 different mothers).* P<0.05, *** P<0.0001.

Figure 1
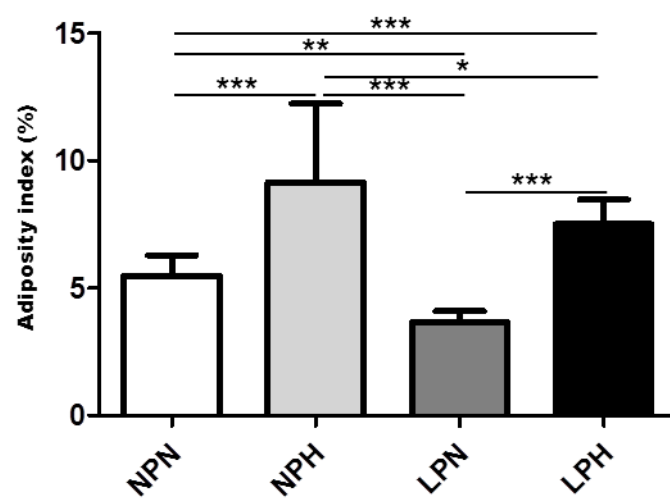
Table 1

	NPN	NPH	LPN	LPH
Total cholesterol (mg/dL)	45.5 ± 4	63 ± 13.6*	56 ± 6.1	71.7 ± 7.2**
HDL (mg/dL)	13.2 ± 2.1	11.2 ± 2.5	11 ± 1.7	8.7 ± 1.9*
LDL (mg/dL)	32.3 ± 4.7	37.8±9.3	36.8 ±6.1	46.4 ±12.1
Triglycerides (mg/dL)	36.7 ± 8.7	67 ± 23	32.5 ± 10.1#	56.2 ± 19

The data represent the mean ± SD (N = 5). * vs NPN, # vs NPH. *# $P<0.05$; ** $p<0.001$.

Figure 2

*** LPN vs LPH
** NPH vs LPN
* NPN vs LPH
* LPN vs LPH
* NPN vs NPH
LPN vs LPH
NPH vs LPN
NPN vs LPH
***
NPN vs LPH
NPN vs LPN
NPN vs LPH
NPH vs LPN
LPN vs LPH
Urinary pH
8
7
6
5
8
9
10
11
12
13
14
Weeks of life
NPN
NPH
LPN
LPH

Figure 3

Arterial Pressure (mmHg)
170
160
150
140
130
120
8
10
12
Weeks of life
*NPH vs LPN
**NPN vs LPH
**NPH vs LPH
*NPN vs LPN
*NPN vs NPH
***NPN vs LPH
*NPH vs LPH
NPN
NPH
LPN
LPH

Figure 4

800
600
400
200
0
CCr (μL/min/100g)
NPN
NPH
LPN
LPH
1.5
1.0
0.5
0.0
CNa+ (ml/min/100g b.w.)
***
*
***
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
FENa+ (%)
***
*
***
***
**
30
20
10
0
FEPNa+ (%)
***
**
*
*
0.12
0.08
0.04
0.00
FEK+ (%)
1.5
1.0
0.5
0.0
FEPPNa+ (%)

Figure 5

Figure 6

Figure 7
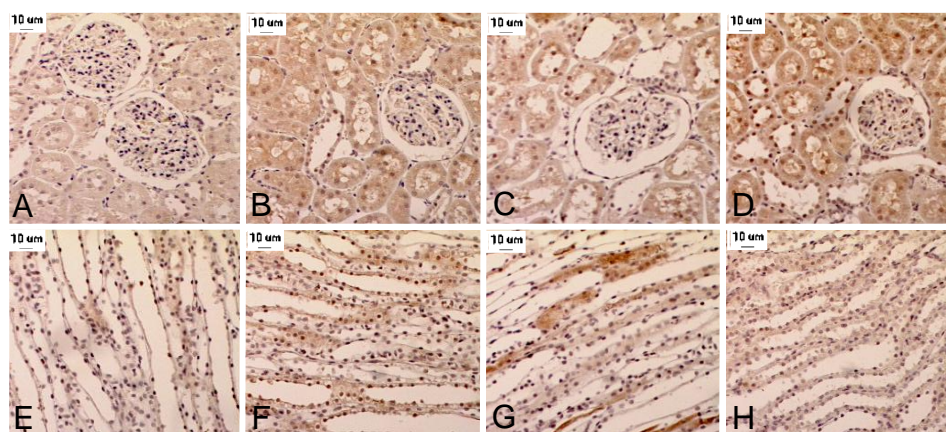
Figure 8
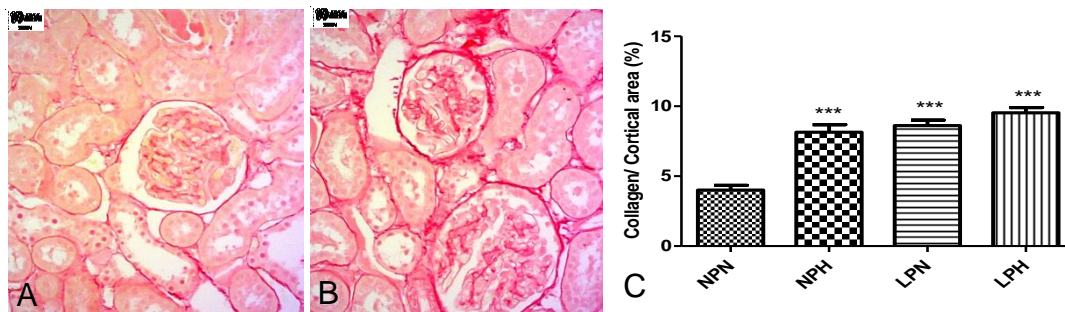
Figure 9

Figure 10

Figure 11